



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

SAZAN BALIKLARINA ARSENİK UYGULAMASI SONUCU BİYOKİMYASAL,
HİSTOPATOLOJİK, MİKROBİYOLOJİK VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERDE
MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİLERİ

SEDA PINAR DÜNDAR

Temmuz 2010

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

SAZAN BALIKLARINA ARSENİK UYGULAMASI SONUCU BİYOKİMYASAL,
HİSTOPATOLOJİK, MİKROBİYOLOJİK VE HEMATOLOJİK
PARAMETRELERDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER ÜZERİNE PROPOLİSİN
ETKİLERİ

SEDA PINAR DÜNDAR

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. ZELİHA S. TALAS

Temmuz 2010

Seda Pınar DÜNDAR tarafından **Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU TALAS** danışmanlığında hazırlanan “**Sazan Balıklarına Arsenik Uygulaması Sonucu Biyokimyasal, Histopatolojik, Mikrobiyolojik ve Hematolojik Parametrelerde Meydana Gelen Değişimler Üzerine Propolisin Etkileri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. İbrahim ÖRÜN (Aksaray Üniversitesi)

Üye : Doç. Dr. Zeliha S. TALAS (Niğde Üniversitesi)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Kenan ERDOĞAN (Aksaray Üniversitesi)

ONAY:

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../20.... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../20.... tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

Doç. Dr. Nurettin ACIR
MÜDÜR

ÖZET

SAZAN BALIKLARINA ARSENİK UYGULAMASI SONUCU BİYOKİMYASAL, HİSTOPATOLOJİK, MİKROBİYOLOJİK VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERDE MEYDANA GELEN DEĞİŞİMLER ÜZERİNE PROPOLİSİN ETKİLERİ

DÜNDAR, Seda Pınar

Niğde Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Zeliha SELAMOĞLU TALAS

Temmuz 2010, 95 sayfa

Bu çalışmada, arsenik (As) toksisitesine maruz kalan, ekonomik ve besinsel değeri olan pullu sazan (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) balıklarında meydana gelen oksidatif strese karşı propolisin etkilerini gözlemlemek amacıyla biyokimyasal, hematolojik, histolojik ve mikrobiyolojik analizler yapılmıştır.

Bu çalışmada; kontrol grubu, arseniğe maruz bırakılmış sazan, propolis uygulanmış sazan ve arsenik ile birlikte propolis uygulanmış sazan balıkları olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Gruplardaki balıkların karaciğer, solungaç ve kas dokularında katalaz (CAT) aktivitesi ve malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlendi. Ayrıca karaciğer, solungaç ve kas dokularında histolojik incelemeler yapıldı. Yine kas örneklerinde et kalitesi üzerine arsenik ve propolisin etkilerini tayin etmek amacıyla biyokimyasal [malondialdehit (MDA) düzeyi, toplam uçucu bazik azot (TVB-N) ve laktik asit miktarı ile pH değerleri] ve mikrobiyolojik analizler yapılarak, elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Balıklardan alınan kan örneklerinde ise biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin çalışılmasının yanı sıra, eritrosit morfolojilerindeki değişimler de belirlendi.

Çalışma sonucunda arsenik ve arsenik+propolis ve propolis'e maruz kalmış grupların CAT aktivitelerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalışlar gözlenirken ($P<0.05$), kontrole göre uygulama gruplarının MDA düzeylerinde meydana gelen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$).

Biyokimyasal parametrelerin metabolit değerleri incelendiğinde; propolis grubu total protein, kreatinin, globulin ve albümin değerlerinde kontrole göre anlamlı değişikliklerin olmadığı saptanırken ($P>0.05$), glukoz değerinde propolis, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında anlamlı değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Trigliserit, üre ve total kolesterol değerlerinde arsenik ve arsenik+propolis gruplarında kontrol ve propolis grubuna göre anlamlı azalışlar olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$).

Kan parametrelerinde elektrolit düzeylerine bakıldığında, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında kontrol ve propolis grubu Ca, P ve Na seviyelerine göre anlamlı bir azalış görülürken ($P<0.05$), arsenik grubunda arsenik+propolis grubuna göre anlamlı bir azalış meydana gelmiştir ($P<0.05$). K seviyesine bakıldığında; kontrol grubunda, propolis ve arsenik grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir ($P>0.05$). Arsenik+propolis ve arsenik grupları karşılaştırıldığında ise arsenik grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir ($P<0.05$).

Enzimatik parametrelerde ise, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis grubunda ALP, ALT, AML, AST, LDH düzeylerinde anlamlı değişiklikler olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Propolis grubunda kontrole göre ALP, ALT, AML, AST ve LDH değerlerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir ($P>0.05$). Arsenik ve arsenik+propolis grupları enzim değerleri karşılaştırıldığında ise; ALP, ALT, AML, AST, LDH düzeylerinde meydana gelen artış ve azalışların anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.05$).

Hematolojik parametreler (WBC, granülosit, agranülosit, RBC, HB, HCT) analiz edildiğinde, propolis grubu değerleri ile kontrol grubu arasında anlamlı değişiklikler gözlenmezken ($P>0.05$), arsenik ve arsenik+propolis grubu WBC, granülosit, agranülosit, RBC, HB ve HCT değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı değişiklikler olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). Eritrosit indekslerinde arsenik ve arsenik+propolis grubu MCV ve MCH değerlerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı

gözlemlenirken ($P<0.05$), arsenik+propolis grupları eritrosit indekslerinin propolis ve kontrole yaklaştığı görülmektedir ($P>0.05$).

Kas biyokimyası (laktik asit miktarı, pH, TVB-N ve MDA düzeyi) ve mikrobiyolojisi incelendiğinde kontrol, arsenik+propolis ve propolis grubuna göre, arsenik uygulama grubunda laktik asit, MDA ve TVB-N değerleri anlamlı şekilde artmıştır ($P<0.05$). Arsenik ve propolis uygulamaları, kontrol grubuna göre pH düzeyini istatistiksel olarak önemli derecede düşürmüştür ($P<0.05$). Psikrofilik ve mezofilik bakteri sayımları yapıldığında; arseniğin balığın doğal mikroflorası üzerine üremeyi durdurucu etkisi görülmüştür. Ancak propolisin etkisinin arsenikten daha da fazla olduğu dikkat çekmektedir. Propolis+arsenik birlikte sinerjik etki göstererek mezofilik ve psikrofilik bakteri sayısını istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır ($P<0.05$). Propolis uygulaması sonucu sazan kas dokusundaki biyokimyasal ve mikrobiyolojik değişimler göz önünde tutularak bu doğal arı ürünü, balık yetiştiriciliği ve balık eti kalitesinin iyileştirilmesi üzerine yeni bir ajan olarak dikkat çekmektedir.

Histopatolojik çalışmalar sonucunda; arseniğin karaciğer ve kas dokularında çok bariz histopatolojiye neden olmadığı gözlemlendi. Ancak solungaç dokusunda sekonder lamellerde birleşmelerin ve hücre kayıplarının olduğu, hatta yer yer sekonder lamellerin düzleştiği görüldü. Arsenik+propolis uygulanan dokularda ise bu hasarların daha az olduğu tespit edildi. Eritrosit morfolojileri bakımından da gruplar arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

Anahtar sözcükler: Biyokimyasal parametreler, Pullu sazan, Hematoloji, Histoloji, Solungaç, Karaciğer, Kas doku, Mikrobiyoloji, Arsenik, Propolis, Eritrosit morfolojisi

SUMMARY

THE EFFECTS OF PROPOLIS ON BIOCHEMICAL, HISTOPATHOLOGICAL,
MICROBIOLOGICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS CHANGES ON
THE RESULTS OF ARSENIC APPLIED TO CARP

DUNDAR, Seda Pinar

Nigde University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Zeliha SELAMOGLU TALAS

July 2010, 95 pages

In this study, biochemical, histopathological and microbiological effects of propolis on common carp (*Cyprinus caprio*) exposed to arsenic was investigated.

In the study, catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) levels determined on liver, gill and muscle tissues groups of control, arsenic, propolis and arsenic+ propolis. Histopathological analyses studied on liver, gill and muscle tissues. To determine the effects of propolis and arsenic on meat quality, biochemical analyses [malondialdehyde (MDA) level, total volatile basic nitrogen (TVB- N) and lactic acide amount and pH value] and microbiological analyses was considered statically. On blood samples biochemical, histopathological, hematological parameters and changes on eritrocyte morphology was determined.

At the end of the study, CAT activities of the carp tissues exposed to arsenic and arsenic+propolis were recorded significantly staticant decrease while comparating to control group ($P<0.05$). Statically significant increases on MDA levels of exposure group have been observed according to control group ($P<0.05$).

When metabolite values of biochemical parameters were examined, changes on total protein, creatinine, globulin and albumin values were not statically significance

according to control group ($P>0.05$). But on glucose value statically significantly changes were observed on arsenic and arsenic+propolis groups ($P<0.05$), triglyceride, urea and total chollesterol values were significantly decreased according to control and propolis group ($P<0.05$).

On electrolyte parameters, arsenic ve arsenic+propolis groups' Ca, P ve Na values statycally significantly decreased according to control and propolis groups ($P<0.05$). On arsenic group,there were significantly change according to arsenic+propolis group ($P<0.05$). On control group K levels there were no change according to propolis and arsenic groups ($P>0.05$). On arsenic+propolis group K values there were statycally significantly increase according to arsenic groups ($P<0.05$).

On enzymatic parameters; arsenic and arsenic+propolis groups' ALT, ALP, AML, AST, LDH parameters significantly changes were observed according to control group ($P<0.05$). While there were no statically significance changes on ALP, ALT, AML, AST ve LDH values of propolis group according to arsenic group ($P>0.05$).

On hematological parameters; on arsenic and arsenic+propolis group WBC, granulocyde, agranulocyde, RBC, HB and HCT values were statistically significantly changed ($P<0.05$). While erythrocyte index of arsenic and arsenic+propolis groups MCV and MCH values statistically increasing ($P<0.05$), it was not observed statistically significant change on arsenic+propolis group according to propolis and control groups ($P>0.05$).

When muscle biochemistry (lactic acide value, pH, TVB- N and MDA level) and microbiological analyses were investigated, statistically significantly changes were observed on exposure groups according to control group ($P<0.05$). In addition to, lactic acide, MDA levels and TVB- N values of arsenic group were increased statistically according to control, propolis and arsenic+propolis ($P<0.05$). Besides on propolis+arsenic exposures pH values decreased according to control group ($P<0.05$). When pshyrophilic and mesophylic bacteria accounts were investigated, it was observed that arsenic has effect of stopped producing. With sinergistic effects of propolis+arsenic, it has occured on bacteria account statistically significantly decrease ($P<0.05$).

At the results of histopathological analyses observed that arsenic didn't caused significantly histopathology. But on gill tissue combination of seconder lamella and cell lose, on the other hand seconder lamella flatteningwas observed. There were no chages among blood tissue group erythrocyte morphology analyses.

Keywords: Biochemical parameters, Carp, Hematology, Histology, Gill, Liver, Muscle tissue, Microbiology, Arsenic, Propolis. Erythrocyte morphology.

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerime ilk adım attığım andan bu yana bizden maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili hocam Doç. Dr. Zeliha Selamoğlu TALAS'a, çalışmalarımın yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen saygı değer hocalarım Doç. Dr. İbrahim ÖRÜN, Yrd. Doç. Dr. Ayhan DURAN, Yrd. Doç. Dr. Kenan ERDOĞAN ve İlknur ÖZDEMİR'e, Manevi desteğinden dolayı Doç. Dr. Mustafa TALAS'a, deney ve çalışmalarımın her aşamasında ve sosyal hayatımda her zaman yanımda olan canım dostum Ayşe GÖĞEBAKAN'a ve ekip arkadaşlarım Mehmet Fuat GÜLHAN ve Oğuz Murat PAŞAOĞLU'na, histolojik preparatlarımın hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen Niğde Devlet Hastanesi patoloji laboratuvarı ekibine...

Son olarak bugünlere gelmemde en önemli yeri olan, benden hiçbir zaman maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen canım Ailem'e teşekkürleri bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
KISALTMA ve SİMGELER	xvii
BÖLÜM I. GİRİŞ	1
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Ağır Metaller	3
2.1.1 Arsenik	4
2.2 Oksidatif Stres ve Etkileri	6
2.2.1 Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri	7
2.2.1.1 Süperoksit radikali (O_2^-)	8
2.2.1.2 Tekil oksijen radikali (O^-)	9
2.2.1.3 Hidroksil radikali (OH^-)	9
2.2.1.4 Hidrojen peroksit (H_2O_2)	9
2.3 Antioksidan Savunma Sistemleri	10
2.3.1 Enzimatik savunma sistemi ve özellikleri	10
2.3.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	11
2.3.1.2 Katalaz (CAT)	11
2.3.1.3 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px).....	12
2.3.2 Enzimatik olmayan savunma sistemleri ve özellikleri	12
2.4 Propolis	13
2.4.1 Genel özellikleri	13
2.4.1.1 Propolisin tarihçesi	13
2.4.1.2 Fiziksel özellikleri	14
2.4.1.3 Kimyasal yapısı ve kaynağı	14
2.4.1.3.1 Flavanoidler	15
2.4.1.3.2 Kafeik asit fenil etil ester (CAPE)	16
2.4.2 Propolisin biyolojik özellikleri	17
2.4.2.1 Antimikrobiyal etkisi	17

2.4.2.1.1 Antibakteriyel etkisi	18
2.4.2.1.2 Antiviral etkisi.....	18
2.4.2.1.3 Antifungal aktivitesi.....	19
2.4.2.1.4 Antiprotozoan aktivitesi	19
2.4.2.2 Sitotoksik aktivitesi	19
2.4.2.3 Antiinflamatuvar etkisi	20
2.4.2.4 Antioksidan özellikleri	20
2.4.2.5 Antikarsinojenik etkisi	21
2.5 Çalışılan Deney Hayvanı Hakkında Genel Bilgi	22
2.6 Çalışılan Dokular Hakkında Genel Bilgiler	23
2.6.1 Karaciğer dokusunun yapı ve fonksiyonları	23
2.6.2 Solungaç dokusunun yapı ve fonksiyonları	23
2.6.3 Kas dokusunun yapı ve fonksiyonları	23
2.6.4 Kan dokusunun yapı ve fonksiyonları	24
2.7 Dokularda Çalışılan Biyokimyasal Parametreler Hakkında Bilgi.....	25
2.7.1 Malondialdehit	25
2.7.2 Katalaz	25
2.8 Çalışılan Mikrobiyolojik Parametreler Hakkında Genel Bilgi.....	26
2.8.1 Psikrofilik bakteriler	26
2.8.2. Mezofilik bakteriler	26
BÖLÜM III. MATERYAL ve METOD	27
3.1. Materyal	27
3.1.1 Propolis ekstraktının hazırlanması	27
3.1.2 Arsenik	27
3.1.3 Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler	27
3.1.4. Deneyde kullanılan aletler	28
3.1.5 Balıkların temini ve deneysel grupların hazırlanışı	28
3.2 Metod.....	28
3.2.1 Diseksiyon işlemi ve doku numunelerinin hazırlanması	28
3.2.2 Biyokimyasal ve hematolojik analizler için kan örneklerinin hazırlanması.....	29
3.2.3 Biyokimyasal çalışmalar için doku numunelerinin hazırlanması.....	29
3.2.4 Histopatolojik çalışmalar için numune hazırlanması	30

3.2.5 Kas biyokimyası ve mikrobiyolojisi için doku numunelerinin hazırlanması.....	30
3.2.6 Protein tayini	30
3.2.6.1 Kullanılan reaktifler	31
3.2.6.2 Deneyin yapılışı	31
3.2.6.3 Protein miktarının hesaplanması	32
3.2.7 CAT aktivite tayini	32
3.2.7.1 Kullanılan reaktifler	32
3.2.7.2 Deneyin yapılışı	32
3.2.7.3 CAT aktivitesinin hesaplanması	33
3.2.8 Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi	33
3.2.8.1 Kullanılan reaktifler	33
3.2.8.2 Deneyin yapılışı	33
3.2.8.3 MDA düzeyinin hesaplanması	34
3.2.9 Kas dokusunun histopatolojik analizi	34
3.2.10 Karaciğer dokusunun histopatolojik analizi	34
3.2.11 Solungaç dokusunun histopatolojik analizi	35
3.2.12 Eritrositlerin morfolojik analizi	35
3.2.13 Kas dokusunun mikrobiyolojik ve biyokimyasal analizi	36
3.2.13.1 Kas dokusunun mikrobiyolojik analizi.....	36
3.2.13.1.1 TMAB sayımı	36
3.2.13.1.2 PB sayımı	36
3.2.13.2 Kas dokusunun biyokimyasal analizleri	37
3.2.13.2.1 MDA tayini	37
3.2.13.2.2 TVB-N tayini	37
3.2.13.2.3 Laktik asit tayini	37
3.2.13.2.4 pH tayini	38
3.2.14 Kan dokusunun biyokimyasal analizleri	38
3.2.15 Kan dokusunun hematolojik analizleri	38
3.2.16 Verilerin istatistiksel analizi	39
BÖLÜM IV. BULGULAR	40
4.1 Çalışma Gruplarının Dokularında Ölçülen CAT Aktiviteleri.....	40
4.1.1 Kas dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri.....	40
4.1.2 Karaciğer dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri.....	40

4.1.3 Solungaç dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri.....	41
4.2 Çalışma Gruplarının Dokularında Ölçülen MDA Düzeyleri.....	42
4.2.1 Kas dokusunda ölçülen MDA düzeyleri.....	42
4.2.2 Karaciğer dokusunda ölçülen MDA düzeyleri.....	43
4.2.3 Solungaç dokusunda ölçülen MDA düzeyleri.....	44
4.3 Çalışma Gruplarının Dokularında Meydana Gelen Histopatolojik Değişimler...	44
4.3.1 Kas dokularının histopatolojik sonuçları.....	44
4.3.2 Karaciğer dokularının histopatolojik sonuçları.....	47
4.3.3 Solungaç dokularının histopatolojik sonuçları.....	51
4.3.4 Eritrosit morfolojisi sonuçları.....	55
4.4 Çalışma Gruplarının Kas Dokusunda Ölçülen Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	58
4.4.1 Biyokimyasal analiz sonuçları.....	58
4.4.1.1 Laktik asit düzeyleri	58
4.4.1.2 pH	58
4.4.1.3 TVB-N miktarı.....	59
4.4.1.4 MDA düzeyleri	60
4.4.2 Mikrobiyolojik analizler	61
4.4.2.1 TMAB sayımı	61
4.4.2.2 PB sayımı	61
4.5 Kan Dokusunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları	62
4.5.1 Metabolitler	62
4.5.2 Elektrolitler	63
4.5.3 Enzimler	64
4.6 Kan Dokusunun Hematolojik Analiz Sonuçları	66
4.6.1 Hematolojik parametreler	66
4.6.2 Eritrosit indeksleri	67
BÖLÜM V. TARTIŞMA	69
KAYNAKLAR	85

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	İşlenmemiş propolisin genel yapısında bulunan maddelerin oranı.....	15
Çizelge 4.1	Deneyde kullanılan sazanların kas dokularında ölçülen CAT aktiviteleri.....	40
Çizelge 4.2	Deneyde kullanılan pullu sazanların karaciğer dokularında ölçülen CAT aktiviteleri.....	41
Çizelge 4.3	Deneyde kullanılan sazanların solungaç dokularında ölçülen CAT aktiviteleri.....	42
Çizelge 4.4	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen MDA düzeyleri.....	43
Çizelge 4.5	Deneyde kullanılan pullu sazanların karaciğer dokularında ölçülen MDA düzeyleri.....	43
Çizelge 4.6	Deneyde kullanılan pullu sazanların solungaç dokularında ölçülen MDA düzeyleri.....	44
Çizelge 4.7	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen laktik asit miktarları.....	58
Çizelge 4.8	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen pH değerleri.....	59
Çizelge 4.9	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen TVB-N miktarları.....	59
Çizelge 4.10	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen MDA düzeyleri.....	60
Çizelge 4.11	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında TMAB sayımı.....	61
Çizelge 4.12	Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında PB sayımı.....	61
Çizelge 4.13	Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen metabolit düzeyleri.	64
Çizelge 4.14	Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen elektrolit değerleri..	63
Çizelge 4.15	Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen enzimatik parametreler.....	66
Çizelge 4.16	Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen hematolojik parametreler.....	67
Çizelge 4.17	Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen eritrosit indeksleri.....	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Pullu sazan (<i>Cyprinus carpio</i> , Linnaeus 1758).....	22
Şekil 4.1	Kontrol grubu kas dokusunun normal histolojik görünümü(HEx100)...	45
Şekil 4.2	Propolis grubu kas dokusu kesitlerinde histopatolojik görünüm, nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100).....	45
Şekil 4.3	Arsenik grubu kas doku kesitlerinde histopatolojik görünüm, nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100).....	46
Şekil 4.4	Arsenik+propolis grubu kas dokusu kesitlerinde histopatolojik görünüm,nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100).....	46
Şekil 4.5	Kontrol grubu karaciğer dokusun histolojik görünümü, normal hepatositler (HEx100).....	47
Şekil 4.6	Kontrol grubu karaciğer dokusun histolojik görünümü, normal hepatositler (HEx200).....	48
Şekil 4.7	Propolis uygulama grubu karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm, mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (HEx100).....	48
Şekil 4.8	Propolis uygulama grubu karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm, mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (HEx100).....	49
Şekil 4.9	Arsenik grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm. A-Konjesyon, B- Hidrofik dejenerasyon ve C- Mononükleer hipertrofi, (HEx100).....	49
Şekil 4.10	Arsenik grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm. A- Konjesyon, B- Hidrofik dejenerasyon ve C- Mononükleer hipertrofi (HEx200).....	50
Şekil 4.11	Arsenik+propolis grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm. A- Konjesyon ve B- Hidrofik dejenerasyon (HEx100).....	50
Şekil 4.12	Arsenik+propolis grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm. A- Konjesyon ve B- hidrofik dejenerasyon (HEx200).....	51
Şekil 4.13	Kontrol grubu solungaç dokusunun normal histolojik görünümü (HEx40).....	52
Şekil 4.14	Propolis grubu solungaç dokusunda meydana gelen vakuol oluşumları (oklar) (HEx40).....	52

Şekil 4.15	Propolis grubu solungaç dokusunda meydana gelen vakuol (oklar) oluşumları, (HEX100).....	53
Şekil 4.16	Arsenik grubu solungaç doku kesitlerinde histopatolojik görünüm. A- Vakuol oluşumu, B- Nekroz (Teleangioectasiae), C- Sekonder lamellerinin ucunun çomaklaşması, D- Sekonder lamellerin düzleşmesi (HEX100).....	53
Şekil 4.17	Arsenik grubu solungaç dokusunda meydana gelen kıkırdak doku hasarı (oklar) ve sekonder lamellerin düzleşmesi (HEX100).....	54
Şekil 4.18	Arsenik grubu dokusunda meydana gelen sekonder lamellerin düzleşmesi (oklar) (HEX40).....	54
Şekil 4.19	Arsenik+propolis uygulama grubu solungaç doku kesitlerinde histolojik görünüm (HEX40).....	55
Şekil 4.20	Kontrol grubu eritrosit morfolojilerinin histolojik görünümü (HEX200).....	56
Şekil 4.21	Propolis grubu eritrosit morfolojilerinin histolojik görünümü (HEX200).....	56
Şekil 4.22	Arsenik grubu eritrosit morfolojilerinin histolojik görünümü (HEX200).....	57
Şekil 4.23	Arsenik+propolis eritrosit morfolojilerinin histolojik görünümü (HEX200).....	57

KISALTMA ve SİMGELER

KISALTMA/SİMGE

ALB	Albumin
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AML	Amilaz
As	Arsenik
AST	Aspartat aminotransferaz
BSA	Bovin serum albumin
Ca	Kalsiyum
CAPE	Kafeik asit fenil etil ester
CAT	Katalaz
CK	Kreatinin
EDTA	Sodyum etilendiamin tetra asetik asit
EEP	Etanolik propolis ekstraktı
GLOB	Globulin
GSH	Redükte glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSSG-Rx	Glutatyon redüktaz
HB	Hemoglobin
HCT	Hematokrit
HE	Hematoksilen eozin
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
K	Potasyum
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojenfosfat
K ₂ HPO ₄	Dipotasyum hidrojenfosfat
LDH	Laktat dehidrogenaz
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama eritrosit hacmi

MDA	Malondialdehit
MIC	Minimum inhibitory concentration
Na	Sodyum
NADH	Nikotinamid adenin denükleotit (redükte)
NADPH	β - Nikotonamid adenin denükleotit 3'-fosfat (redükte)
Na ₂ CO ₃	Sodyum karbonat
Na,K Tartarat	Sodyum-potasyum tartarat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojenfosfat
NaH ₂ PO ₄	Sodyum hidrojenfosfat
NTF	Nötral tamponlanmış formalin
P	Fosfor
PB	Psikrofilik bakteri sayımı
RBC	Eritrosit
PBS	Phosphate buffer saline
POD	Peroksidaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
PUFA	Poli doymamış yap asidi
SOD	Süperoksit dismutaz
TEP	Tetraetoksipropan
TMAB	Toplam mezofilik aerobik bakter
TP	Total protein
TVB-N	Toplam uçucu bazik azot
VLDL	Çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
WBC	Lökosit

BÖLÜM I

GİRİŞ

Günümüzde, çevre kirliliği ve toksik ajanların birikimi, önüne geçilemeyecek derecede büyük bir problem halini almıştır [1]. Özellikle endüstrinin de gelişmesiyle birlikte insanlar için büyük önem taşıyan su, hava ve toprakta sağlığa zararlı olan maddelerin birikmesi önemli bir çevre ve sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Yeryüzünde bulunan su, devamlı bir döngü içindedir. Bu döngü sırasında insanların farkında olarak ya da olmayarak oluşturdukları etkiler sonucu suya karışan maddeler, suyun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmekte ve su kirliliğine neden olmaktadır [2]. Günlük hayatımıza giren bu kirleticiler, toksik, mutajenik ve karsinojenik özellikler taşıması nedeniyle birçok çözüm isteyen problemler ortaya çıkarmaktadır. Bu zararlı maddeler, hücrede serbest oksijen radikallerinin üretimini artırmakta ve hücre düzeyinde oksidatif hasara yol açmaktadırlar. Toksik ajanlara maruz kalınmasıyla oluşan oksidatif hasarlar sonucu yaşlanmaya bağlı kanser gibi bir takım olumsuzluklar meydana gelmektedir [1].

Kirletici ve toksik etkileri olan ağır metaller, tarım alanlarına ve sucul ekosisteme; kırsal ve endüstriyel üretim alanları, yağmur suları ve kirli su arıtmaları gibi uzun süreli ekotoksikolojik etkilere sebep olabilecek yollarla girebilmektedir [3]. Toksik etkilerin başlangıcı, fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlarla populasyon veya ekosistem düzeyinde olmaktadır. Bu nedenle, bu etkilerin incelenmesinde en önemli bilgiler, canlıların fizyolojik, histolojik ve biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi sonucu elde edilmektedir [4].

Sucul ortamın kirlenmesi, bu ortamda yaşayan canlıları da olumsuz etkilemektedir. Sudaki oksijen miktarının azalması nedeniyle bakteriler, çürümüş organik maddeler, metal tuzları ve toksik maddelerin miktarları artar ve bu durumdan dolayı sucul ortamda yaşayan bitkiler, balıklar ve diğer sucul organizmalar ölebilir veya bu organizmalar zehirli maddeleri bünyelerinde depolayarak besin zinciri yoluyla diğer canlılara ulaştırabilirler [5]. Bu birikimden öncelikle sucul canlılar, özellikle de besin zincirinin bir halkası olan ve önemli bir protein kaynağı olarak tüketilen balıklar büyük oranda

zarar görmektedir. Dolaylı olarak (planktonlar aracılığıyla) ya da direkt olarak balıkların metabolizmasına katılan ağır metaller, özellikle de yüksek derecede karsinojen etkiye sahip olan arsenik ağır metali, besin zinciri ile insana kadar ulaşabilmektedir [6,7]. Ağır metallerin suda bulunan tuz formları ve bu formların balıklara olan etkisi; suyun osmotik basıncı, sertliği, yoğunluğu, pH'sı, sıcaklığı ve su içinde bulunan serbest oksijen miktarına bağlı olarak değişim göstermektedir [2].

Balıkların sağlık durumlarının bir göstergesi olarak sıkça kullanılan biyokimyasal ve hematolojik parametreler, herhangi bir stres durumunda organizmanın dış çevreye karşı fizyolojik tepkileri hakkında önemli bilgiler elde etmemize yardımcı olmaktadır. Herhangi bir toksik maddenin subletal toksisite çalışmaları; meydana gelen fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile letal etkilerin oluşturduğu tehditleri de anlamamıza yardımcı olur [7].

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Ağır Metaller

Gün geçtikçe artan çevre kirliliği, dolayısıyla meydana gelen ağır metal birikimleri ile insan ve hayvan sağlığını önemli ölçüde tehdit edilmekle birlikte hava, su ve toprak olumsuz etkilenerek doğal dengenin ve çevre sağlığının bozulmasına neden olmaktadır. Ağır metaller, yer kabuğunda doğal olarak bulunan ve herhangi bir zamanda canlı organizmalarda biyolojik birikime uğrayabilen bileşiklerdir. Bu ağır metallerin canlı vücuduna alınmaları ve depolanmaları, metabolize edilmelerinden veya atılmalarından daha hızlıdır ve oldukça da toksik maddelerdir. Canlılarda meydana gelen bu birikim, birçok biyolojik hasar meydana getirebilmektedir [6]. Metabolize edilmelerinin ardından canlı için hayati önemi olan proteinler, enzimler ve nükleik asitler gibi hayati makromoleküllere bağlanarak hücrelerin yapı ve fonksiyonlarını etkilerler [8].

Ağır metaller tüm canlılarda, özellikle ekosistem içinde insanlar tarafından tüketilen ve önemli bir protein ve omega-3 [9] kaynağı olan balıklarda da son derece hasarlayıcı toksik etkiler oluşturmaktadır. Bu etki metalin cinsi ve konsantrasyonuna, su kalitesine ve balığın tür ve yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. Bazı ağır metaller mikro düzeyde toksisite gösterse bile, canlının fizyolojisini etkileyerek, gelişmesini yavaşlatmakta ya da üreme yeteneğini kaybetmesine sebep olmaktadır. Ağır metallerin balık vücudunda birikimi; beslenme, solunum ve ayrıca suyu süzmeleri esnasında meydana gelmektedir [10].

Ağır metaller su kaynaklarına; endüstriyel atıkların veya asit yağmurlarının toprağa geçişi sonucu, bileşiminde bulunan ağır metallerin çözünmesi ile ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla geçerler. Sediment tabakasının adsorbsiyon kapasitesinin sınırlı oluşundan dolayı da suların ağır metal konsantrasyonu sürekli olarak yükselmektedir [11]. Gün geçtikçe konsantrasyonu yükselen ve toksik etkisi oldukça fazla olan ağır metallerden biri de arseniktir.

2.1.1 Arsenik

Arsenik, kimyada As sembolü ile gösterilir. Periyodik cetvelde azot ailesinde bulunur ve metalloid özellik gösterir [12,13]. Bazı biçimleri metale benzer, fakat element olarak genellikle, ametal sınıfında yer alır. Bileşikleri gri ve sarı kristaller olarak iki ayrı biçimde bulunan arsenik, M.Ö. 4. yüzyıl'dan beri bilinmesine rağmen, element olarak ancak 17. yüzyıl'da tanımlanmıştır. Bazı belgelere göre arsenik, ilk kez Alman eczacı Johann Schroeder tarafından serbest element halinde tanımlanmış ve arseniğin oksidi ise, 1649'da arseniğin taş kömürü ile ısıtılması sonucu elde edilmiştir. Bakır, kurşun gibi metallerin eritilmesiyle de yan ürün olarak arsenik oluşabilmektedir [12].

Arseniğin atom numarası 33 ve atom ağırlığı 74,91'dir [13]. Periyodik cetvelin 5A grubundandır. Fosfor ile antimon arasında yer alır ve ikisinin arasında özellikler gösterir. Arsenik, yaptığı bileşiklerde +5, +3 ve -3 değerlikleri alabilir [14]. Yeryüzünde çok az bulunmakla birlikte, geniş dağılım gösteren bir elementtir [13]. Arsenik elementi, genellikle, organik, inorganik ve gaz (arsin) formlarında bulunur. Gaz formu en toksik formudur. Doğada en çok bulunan formu ise; inorganik formu olan arsenik trioksittir (AsO_3). Arsenik; ppm'den ppd'ye değişen konsantrasyonlarda toprakta, suda ve canlı organizmalarda bulunmaktadır. Özellikle, arseniğin (+5) değerlikli bileşiklerine diğer bileşiklere oranla toprakta daha fazla rastlanmaktadır. Toprakta 0,1-40 ppm miktarlar arasında arseniğe rastlamak mümkündür. Oranları topraktaki organik maddelere de bağlı olan arsenik, organik maddelerin okside olmasıyla birlikte suya, oradan da sucul canlılara ve bitkilere geçmektedir. İşlenmemiş verimli toprakların milyonda bir ya da birkaç oranlık kısmında arsenik bulunmaktadır. Fakat içeriğinde arsenik olan pestisitlerin toprakta birkaç yıl kullanılması sonucu arsenik, bu miktarın birkaç yüz katı kadar artış göstermektedir [12].

Arsenik oranı, doğal su kaynakları ve denizlerde değişkenlik gösterebilmektedir. Su ısısının arttığı yerlerde arsenik miktarı da artmaktadır [12]. Deniz suyunda yaklaşık olarak, milyonda 10 oranında bulunmaktadır. Arseniğin, bazı arsenik yataklarında element halinde olduğu bilinmektedir, fakat arseniği; arsenit (AsO_2) ve arsenat (AsO_3) gibi mineraller şeklinde bulunduran yataklar daha yaygın haldedir. Doğada en çok

bulunan diğler arsenik bileşikleri ise; realgar (As_4S_4), orpigmen (As_2S_3) ve arsenikli nikel sülfür ($NiAsS$)'dür [13].

Arseniğin üç allotropu vardır. Bunlardan gri olanı, metalik halde bulunmaktadır. Kararlı ve çok yoğun bir formdur. Sarı arsenik ise; ametalik haldedir, dört atomlu arsenik moleküllerinden (As_4) meydana gelmiştir ve uçucu formdadır. Bu yapı, arsenik buharının ani soğutulması sonucu elde edilmektedir. Amorf olan siyah arsenik, arsin (AsH_3)'in ısı ile bozunmasından elde edilir [12].

Yumuşak haldeki siyah arsenik ile sarı arsenikten daha kararlı olan ve doğada daha bol bulunan gri arsenik; ısıyı çok iyi iletir, elektriği ise bakırın % 5'i kadar iletir, kolay kırılır, hava ile temas ettiğinde kararır ve hızla yüksek sıcaklıklara kadar ısıtıldığında erimeksizin doğrudan buhar haline geçer. Buhar soğutulduğunda ise sıvılaşımadan yeniden kristalsi katı haline döner, yani süblimleşir [12,14]. Metalsi (gri) arsenikte aynı şekilde, 610 derecede sıvı hale geçmeden, doğrudan katı halden, buhar haline geçmektedir (süblimleşir). 36 atmosfer basıncı altında, 814 derecede erimektedir. Özgül ağırlığı $5,7 \text{ g/cm}^3$ 'tür, 400 derecenin üstünde yanar ve arsenik trioksit (As_2O_3) oluşur.

Arsenik trioksit (As_2O_3), su ile tepkimeye girdiğinde arsenit asidini ($HAsO_2$) verir. Özgül ağırlığı $3,87 \text{ g/cm}^3$ 'tür. Alkalilerde çözüldüğünde arsenit tuzlarını verir. Şiddetli zehir olma özelliğine sahiptir [14]. As_2O_3 yapısı dışçilikte kullanılır. Mide ve vücudun diğler kısımlarında yer yer iltihaplanmalara sebep olur ve 0,06 ile 0,2 g. arası dozlarda canlılarda öldürücü etkiye sahiptir [12,14]. Arseniğin siyah, sarı ve griden başka biçimlerine de rastlanmıştır [12]. Bunlardan biri de beyaz renkli arsenik pentaoksittir (AsO_4). Bu form, su ile arsenat asidini (H_3AsO_4) oluşturur [14]. Arsenik; kükürt, halojen ve metallerle reaksiyon verebilme özelliğine sahiptir [12]. Arsenik, kükürt ile tepkimeye girdiğinde As_4S_3 , As_4S_4 (kırmızı arsenik), As_2S_3 (sarı arsenik) ve As_2S_5 bileşiklerini oluşturur. Bunlar asidik özellik gösterip, kuvvetli bazlarla çözünme yeteneğine sahiptirler. Kırmızı arsenik sülfür ve sarı arsenik sülfürleri pigment olarak da kullanılırlar [14]. Bakır asetoarsenit (Paris yeşili) uzun yıllar boyunca insektisit olarak kullanılmıştır [12,14]. Kurşun ve kalsiyum arsenat ise, özellikle tütün ve pamuk tarımında insektisit olarak kullanılmıştır. Ahşapların korunmasında çinko ve krom arsenatlar kullanılmaktadır. Arsenik bileşikleri, özellikle ciltte, gözde ve solunum

yollarında tahrip edici etkiler gösterdiğinden savaş gazı olarak da kullanılmıştır [12]. $\text{Na}_3\text{AsO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ bileşiği; matbaa mürekkebi, tekstil boyaları ve böcek öldürücü olan kalsiyum ve kurşun arsenatların üretiminde kullanılırlar. Potasyum dihidrojen arsenat (KH_2AsO_4) ve sodyum meta arsenit (NaAsO_2) bileşikleri; sinek kâğıdı ve böcek öldürücü olarak kullanılmalarının yanı sıra, tekstil boyamada ve derinin korunmasında da kullanılırlar. Arsenik, çoğunlukla kurşunun sert alaşımlarının yapılmasında ve cam endüstrisinde kullanılmaktadır [14].

M.Ö. 5. yüzyılda arsenik bileşikleri tıbbi amaçlı olarak kullanılmıştır. 1909'da Paul Ehrlich; arsenik bulunduran bir organik bileşiğin, frengi hastalığını tedavi ettiğini saptamıştır. Fakat günümüzde bu bileşiklerin yerini antibiyotikler almıştır. Arsenik zehirlenmelerine karşı; kalsiyum, magnezyum ve demir hidroksitleri kullanıldığı gibi, İngiliz tuzu ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) da kullanılabilir. Bu bileşikler, çözünmeyen arsenikleri ortamdaki uzaklaştırarak zehir etkisini de yok etmektedirler. Günümüzde, arsenik gibi ağır metallerin hasarlarını gidermek ve engellemek için doğal yollara da başvurulmaktadır [14].

İnsanlar; endüstriyel atıkları içeren sulardan ve kontamine olmuş topraklardan, bünyelerinde ağır metal biriktirmiş balık ve diğer deniz organizmalarını tüketerek arsenik ağır metale maruz kalmaktadırlar. Bu maruziyet insanlarda; kanser, karaciğer hasarı, deri iltihaplanması ve polinöropati gibi sinir sistemi rahatsızlıklarına yol açmaktadır [13]. Arsenik bütün bu hasarları, oksidatif sürece katılarak ve vücutta stres oluşturarak meydana getirmektedir.

2.2 Oksidatif Stres ve Etkileri

Oksidatif stres; reaktif oksijenler ve hücrel antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması ve toksik etkinin oluşması durumudur. Bu durum, antioksidan savunmanın reaktif moleküllere karşı yetersiz hale gelmesi, reaktif oksijen türlerinin çok fazla üretilmesi ya da her iki durumdan dolayı da meydana gelebilmektedir [15,16].

Oksijenin bulunduğu ortamlarda, çeşitli etkenler sebebiyle oksijen radikalleri meydana gelebilir. Moleküler oksijen, dış orbitalinde iki paylaşılmamış elektron içeren bir yapıya sahiptir. Radikal tanımına göre, oksijen diradikal yapıya sahip olmasına rağmen, reaktivitesi beklenenin tersine çok düşüktür ve tepkimeye gireceği molekülün de benzer yapıya sahip olması gerekir. Yani, farklı orbitallerde spinlerin aynı yönde elektron içermesi gerekir.

Canlıların oksijeni kullanabilmesi için, oksijene doğru bir elektron transferi yaparak spin kısıtlamasını aşmaları gerekir. Oksijenin diğer moleküllerle olan reaktivitesinin kısıtlanması sonucu oluşan spin kısıtlaması için, oksijene elektron transferi yaparak bu kısıtlamayı aşmaları gerekir. Canlılar spin kısıtlamasını yapabilmek için Fe, Cu, Mn, Zn gibi metal iyonlarından yararlanırlar. Oksijen varlığında, ortamdaki farklı faktörlerle oluşan oksijen radikalleri, hücrelere ve dokulara zarar verebilir. Derişimi düşük olan reaktif türler, hücrelerde bulunan antioksidan savunma sistemleri sayesinde, aktivasyonları engellendiği için, önemli toksik etkilere sebep olamazlar. Bu radikallerin yapımları, ancak çeşitli patolojik durumlarda artabilir [17].

2.2.1 Serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri

Oksijen, aerobik koşullarda yaşayan canlılar için oldukça önemli bir molekül olduğu kadar, reaktif oksijen türlerini oluşturması açısından da yüksek oranda tehlikeli bir moleküldür [18]. Atmosferdeki oksijen miktarı belli bir oranı aştığında, insanlar için toksik etki yapmaktadır. Aerobik canlılarda bu radikaller, kendilerini daha çok serbest oksijen radikalleri olarak gösterirler ve meydana gelen değişik metabolik olaylar sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Oksijenin bu hasar verici etkisi, eşlenmemiş elektron içeren serbest oksijen radikallerine dönüşebilmesinden dolayıdır. Serbest halde bulunan radikaller; katyonik, anyonik ya da nötral yapıda bulunabilir ve aşırı derecede reaktif durumdadırlar [19].

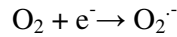
Serbest radikaller son yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulunması sebebiyle, kolayca elektron alışverişi yapabilen atom ya da moleküllerdir ve biyolojik sistemlerde en çok elektron taşınması sırasında ortaya çıkarlar [20].

Hem süperoksit ve hidroksil gibi oksijen içeren serbest radikaller, hem de radikal olmayan, ancak verdikleri reaksiyonlar sonucu, oksijen içeren radikallerin oluşumuna sebep olabilen peroksit, tekil oksijen, hipoklorik asit gibi moleküller, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar [21,22]. Aerobik canlılarda metabolik ve normal fizyolojik süreçler sonucu üretilen reaktif oksijen türleri (ROS), oldukça toksiktir ve biyolojik molekülleri oksitleyerek, doku hasarlarına ve hücre ölümlerine yol açarlar [23].

Reaktif oksijen türleri, metabolizma sonucu insan vücudunda devamlı olarak oluşurlar ve normal şartlarda, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılırlar. Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge, aerobik canlıların yaşamı ve normal metabolik fonksiyonları için önemlidir. Prooksidanların yararına veya antioksidanların zararına bir dengesizlik, canlı vücudunda güçlü hasarlara yol açmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında antioksidanların yetersiz kaldığı durumlarda ya da reaktif oksijen türlerinin üretimlerinin aşırı olduğu hallerde, patolojik durumlar oluşabilmektedir. ROS'lar vücudun doğal koruma sistemlerini geçtiği zaman, vücuda ekzojen antioksidan bileşikler alınmalıdır [23].

2.2.1.1 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), moleküler oksijen (O_2)'in bir elektron alması ile oluşan bir radikaldir. En büyük kaynağı elektron taşıma zinciridir [24].



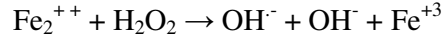
Hidroksil radikaline (OH^{\cdot}) göre daha düşük bir reaktiviteye sahiptir ve hücre zarından geçemez. Süperoksit radikali sulu ortamlarda, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve tekil oksijen (O^{\cdot}) oluşturarak hücrelere hasar verir ve ayrıca geçiş metallerini indirgediği için de önemlidir [25].

2.2.1.2 Tekil oksijen radikali (O[•])

Tekil oksijen radikali, ortaklanmamış elektrona sahip olmadığından dolayı radikal olmayan, fakat kuvvetli okside edici özelliğe sahip olduğu için, reaktif oksijen molekülü olarak adlandırılmaktadır. Oksijenin elektronlarından birini kullanarak kendi spininin ters yönünde dönmesi sonucu meydana gelmektedir. Tekil oksijen radikali, serbest radikal reaksiyonu sonucu meydana gelebileceği gibi, serbest radikal reaksiyonunun da başlamasına sebep olabilir [25,26]. Bu radikal, hücrelerde bulunan lipitlere etki ederek peroksitlerin oluşmasına yol açar [26].

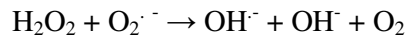
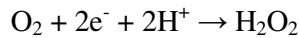
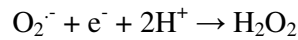
2.2.1.3 Hidroksil radikali (OH[•])

Hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesiyle (Fenton Reaksiyonu) ya da suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucu oluşan, en reaktif okside edici radikaldir [27]. Yüksek bir reaksiyon hızına sahiptir ve *in vivo* şartlarda hemen hemen bütün moleküllere saldırır. Hidroksil radikalının, hücre membran lipitlerinin çok yakınında olduğu durumlarda; peroksi radikali, lipit hidroperoksitler gibi radikaller de oluşmaktadır ve yarılanma ömürleri çok kısadır [25].

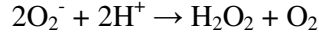


2.2.1.4 Hidrojen peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit, moleküler durumdaki oksijenin iki elektron kazanması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu olur. Bu molekül, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikaline kolayca yıkılır.



Hidrojen peroksit, biyolojik sistemlerde genellikle süperoksidin dismutasyonu ile kendiliğinden gelişir veya süperoksid dismutaz (SOD) katalizöründe meydana gelir.



Hidrojen peroksit, süperoksit radikaline benzerlik göstermektedir. Reaksiyon ortama bağlı olarak, hem oksidan (yükseltgen) hem de redüktan (indirgen) gibi davranabilme özelliğine sahiptir [25]. Biyolojik membranları geçerek intraselüler ortamlara katılırlar ve burada; karbonhidratlar, metalloproteinler, fosfolipitler ve DNA gibi biyomoleküllerle reaksiyona girerek hücrelerde hasar oluştururlar.

2.3 Antioksidan Savunma Sistemleri

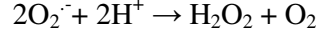
Oksijen, canlıların yaşamlarının devamlılığını sağlayabilmeleri için mutlaka gerekli olan temel bir elementtir. Metabolizmada su haline dönüşebilen oksijenin bir kısmından serbest radikaller de oluşabilmektedir. Oluşan bu serbest radikaller vücutta birçok hasara yol açmaktadır ve vücut bu hasarı gidermek için enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemleri geliştirmiştir.

2.3.1 Enzimatik savunma sistemi ve özellikleri

Enzimler, canlı organizmaların biyolojik reaksiyonlarını hızlandıran, protein yapısında olan ve proteinlerin en büyük grubunu oluşturan biyokatalizörlerdir [28]. Canlı yapısında bulunan enzimlerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Biyokimyasal ve biyolojik sistemlerde katalaz (CAT), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GSSG-Rx), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimleri antioksidan etkiye sahiptir. Antioksidan savunma sistemlerinin, hücreleri serbest radikal veya diğer reaktif moleküllerin hasarından koruması nedeniyle, bu savunma sisteminde CAT, POD, GSSG-Rx, GSH-Px ve SOD gibi antioksidan enzimler büyük öneme sahiptir. Serbest radikallerin zararlı etkileri hücrelerdeki bu antioksidan enzimler tarafından kontrol edilir [29]. Bu sebeple, antioksidan enzimler hem hücrenin kararlılığını muhafaza ettiği için, hem de serbest radikalleri yok ettiği için büyük önem taşımaktadırlar [30,31].

2.3.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Süperoksidin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir ve üç formu vardır.



1- Cu-Zn SOD: Cu ve Zn içeren dimerik tip sitozolde bulunmakla birlikte siyanidle inhibe olur.

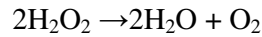
2- Mn-SOD: Mn içeren tetramerik tip mitokondride bulunur ve siyanidle inhibe olmaz.

3- Ekstrasellüler Cu-Zn SOD [32,33].

SOD, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korur. Bu enzimin aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda (özellikle eritrositlerde) daha fazladır. Normal metabolizma sırasında süperoksit üretiminin fazla olmamasının nedeni, SOD sayesinde hücre içi süperoksit düzeyinin düşük tutulmasıdır [25].

2.3.1.2 Katalaz (CAT)

Katalaz, proteinlerin yapısında bol miktarda bulunan karakteristik bir enzimdir. Hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunan ve canlıları oksidatif stresin zararlarından koruyan önemli bir enzimdir [34]. Özellikle hayvan hücrelerinin peroksizom organellerinde, canlı organizmanın eritrosit, karaciğer, böbrek, kemik iliği ve çeşitli dokularında bulunur [35,36]. Tetramerik yapıdaki bu enzim, dört adet ferri hem grubu içerir [37]. Hidrojen peroksit gibi toksik potansiyelli süperoksit iyonlarını, hücrelerden uzaklaştırmada önemli bir rol oynamaktadır [29,37]. Bu uzaklaştırma işlemini hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürerek gerçekleştirir [37].

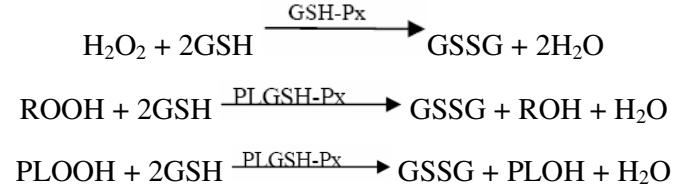


2.3.1.3 Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz; hidrojen peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir.



GSH-Px; tetramerik yapıda, dört selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir ve hücre zarı fosfolipitlerinin hidrojen peroksitlerini alkollere indirgeyebilme yeteneğine sahiptir.



Hücre zarına bağlı en önemli antioksidan olan E vitamini yetmezliği durumunda PLGSH-Px (plazma glutasyon peroksidaz) hücre zarını peroksidasyona karşı korur ve hidroperoksitlerin redükte olması sonucu meydana gelen GSSG, glutasyon redüktazın katalizlediği reaksiyonla tekrar GSH'ye dönüşmektedir.



GSH-Px; solunum patlaması sırasında, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Ayrıca eritrositlerde de GSH-Px, oksidanların oluşturduğu strese karşı antioksidan özellik gösterir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksitin artmasına sebep olur ve hücrelerde şiddetli hasarlara yol açmaktadır [38].

2.3.2 Enzimatik olmayan savunma sistemleri ve özellikleri

Endojen olarak vücutta bulunan antioksidan enzim sistemlerinin yanı sıra, glutasyon ve melatonin gibi enzimatik olmayan endojen antioksidanların yanı sıra, vitaminler ve eser elementler gibi birçok enzimatik olmayan ekzojen antioksidanlar da savunma sistemini

korumada önemli rol oynamaktadır. Propolis de antioksidan savunma sisteminde rol oynayan doğal ekzojen ajanlardan biridir.

2.4 Propolis

2.4.1 Genel özellikleri

Propolis, bal arıları tarafından bitkilerin tomurcuk ve salgılarından toplanan ve balmumuyla karıştırılarak, birçok amaca yönelik olarak kullanılan doğal, reçinemsî bir üründür [39,40,41]. Propolis, işçi arıların arka bacaklarındaki polen sepetçiklerinde özellikle bitkilerin filiz, dal ve tomurcuklarından topladıkları bitki salgılarını ve reçinemsî maddeleri, başlarında bulunan salgı bezlerinden salgılanan enzimlerle biyokimyasal değişikliğe uğratması esnasında bir miktar bal mumu karıştırmasıyla oluşturulur. Propolis, kaynağına göre, kirli sarıdan koyu kahverengiye kadar değişen renkte ve oda sıcaklığında yarı katı halde olan yapışkan organik bir maddedir [42].

Arılar propolisi; kovan içerisindeki besinleri, yavru arıları ve kendilerini çeşitli mikroplardan (virüsler, bakteriler, funguslar vb.) korumak için kovan dezenfeksiyonunda ve ayrıca kovanların yapımı, korunumu ve devamlılığında kullanırlar [39,40,43,44]. Bunun yanında propolis, kovanların çatlamış ve hasarlanmış kısımlarının tamirinde, kovanın dış ortamdan izole edilmesinde, giriş deliklerinin daraltılmasında, kovanın içine giren zararlı maddelerin ve böceklerin mumyalanarak etkisiz hale getirilmesi işlemlerinde de kullanılır [40,41,44].

2.4.1.1 Propolisin tarihçesi

Propolis, Yunanca kökenli bir kelimedir. Eski Yunan'da pro (savunmada olmak ya da korumak) ve polis (şehir) anlamına gelmektedir. Buna göre propolisin tam anlamı "şehrin (kovanın) korunması" dır [44,45]. Propolis çok eski çağlarda ilk kez Yunanlılar tarafından keşfedilerek doğal bir antibiyotik olarak kullanılmıştır. Son yıllarda bu değerli arı ürününün; antibakteriyel, antifungal, antiviral özellikleri yanında anti-inflamatuvar, anti-ülser, lokal anestetik, antitümör, immun sistemi uyarmak gibi çok

sayıda yararlı biyolojik aktivite özelliği göstermesi; tıp, apiterapi, sağlıklı besin üretimi ve biyokozmetik alanında kullanımını yaygınlaştırmıştır [39,40,43,44].

2.4.1.2 Fiziksel özellikleri

Propolis, keskin ve güzel kokulu, acımsı tatta bal mumu ve bitki öz suyundan oluşan bir maddedir [46,41,42]. Karakteristik olarak, lipofilik bir materyaldir [41]. Soğukta sert ve kolay kırılır fakat sıcakta yumuşak ve esnek, nemde ise yapışkandır [41,42]. 15-25 °C arasında ise mum gibi elastik bir yapıdadır [42]. Bu yüzden arı tutkalı olarak da bilinir [41]. Suda az ya da hiç erimeyen propolis, % 95'lik alkolde büyük ölçüde erir. Eter, kloroform, aseton ve diğer organik çözücülerde ise kısmen erir [42,46]. Kaynağına ve yaşına göre hoş aromatik bir kokusu ve sarıdan kahverengiye değişen renkleri vardır [41,42].

2.4.1.3 Kimyasal yapısı ve kaynağı

Propolisin kimyasal yapısı ile ilgili ilk çalışmalar 1970'li yıllarda, kavak ve huş ağacı tomurcuk salgılarının karşılaştırılması üzerine yapılmıştır. Bunun ardından pek çok çalışma yapılmış ve sıcak bölgelerde kavak türleri salgılarının propolisin kimyasal olarak asıl kaynağı olduğu kabul edilmiştir [44].

Propolisler, coğrafik ve bitkisel kökeni, arı türü, arı ırkı ve ekolojik koşullarından dolayı değişik ve kompleks bir kimyasal kompozisyon gösteren, doğal toksik olmayan bir üründür [40-44,46]. İşlenmemiş propolisin yapısında bulunan genel maddeler ve oranları şöyledir: % 45-55 reçine, % 23-25 mumlar ve yağ asitleri, % 10 esansiyel yağlar, % 5 polen ve % 5 diğer organik madde ve mineraller [39,41,42,47]. Bu maddelerin oranları; maddelerin çeşidine, kaynağına, toplanma yeri ve zamanına bağlıdır [41,42]. İşlenmiş propolislerde lipitler yaklaşık % 60.2 oranında bulunurlar. Bu miktarın % 49 kadarını yağ asitleri, % 51'e yakın bir kısmını ise steroller, uzun zincirli alkoller ve hidrokarbonlar gibi sabunlaşmayan maddeler içerir. Propolis ayrıca; flavonoid aglikanlar, fenolik asit ve esterleri, sesquiterpenler, kinonlar, kumarinler, steroidler, amino asitler, fenolik aldehytler, alkoller, ketonlar ve anorganik bileşikler gibi

300 farklı bileşik, 20'den fazla mineral madde, balmumu, reçine ve polen bulunmaktadır [40-43,46,48].

Çizelge 2.1 İşlenmemiş propolisin genel yapısında bulunan maddelerin oranı [39,41]

Maddeler	(%)
Reçine ve zamksı maddeler	50
Bitkisel mumlar	30
Esansiyel yağlar	10
Polen	5
Organik bileşikler ve mineral maddeler	5

Propolis genellikle alkolde çözünerek içerdiği bileşiklere ayrılır. Alkolde çözünen kısmı balzam kısmıdır. Erimeyen kısmı ise balmumu kısmıdır [41].

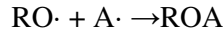
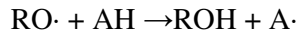
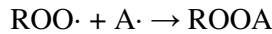
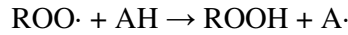
Propoliste bulunan en önemli bileşikler flavanoidler ve sinamik asit türevleridir.

2.4.1.3.1 Flavanoidler

Flavanoidler, propolisin etanolik ekstraktında, miktar olarak en fazla bulunan ve biyolojik aktivite olarak en yüksek aktiviteyi gösteren bileşiklerdir [39,40,46]. Galanin, kamferol, kuersetin, rutin ve krisin major flavonoidlerdir; minor flavonoidler ise isoalpinin, kamferid, ramnositin, ramnetin, pinosembrin ve pinobanksindir [46]. Tüm flavonoidler, 3'-4'dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptir ve iz elementlerle veya radikallerle şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler [42,49]. Flavonoidler ve diğer bitki fenolikleri; süperoksit ($O\cdot^-$), lipid alkoksil ($RO\cdot^-$), peroksil ($ROO\cdot^-$) ve nitrik oksit ($NO\cdot^-$) gibi radikalleri temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α - tokoferol rejenerasyonu fonksiyonlarına ek olarak; vazodilatör, immün sistem uyarıcı, antiallerjik, östrojenik, antiviral (HSV, HIV, influenza ve rinovirüslere karşı) etkileri de söz konusudur [49].

Flavanoidler; Fosfolipaz-A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar özellik gösterirler. Kuersetin ve rutin gibi major flavanoidler ise serum trigliserit seviyesini ve trombosit agregasyonunu azaltarak antitrombolitik etki göstermeleri yanında kuersetin; meme karsinomunda p53 tümör baskılayıcı geninde düzenleyici etki yapmaktadır [49].

Propolisin yapısında bulunan ve antioksidan olarak kullanılan flavanoidlerin, lipit peroksidasyonunu önlediği ve hücre zarındaki doymamış yağ asitlerini, oksidantlara karşı bir antioksidan olan askorbat gibi korudukları bildirilmiştir [42]. Flavanoidler, glikozitler gibi canlı hücrelerde, sıcak asit ve enzimlerle sırasıyla aglikan ve şekerlere yıkılabilirler. Fenolik antioksidanlar (AH), lipit radikallere hızla H⁺ vererek lipit oksidasyonunun ilerlemesini engeller. Görevi, lipit peroksi (ROO·) ve alkoksil (RO·) radikalini parçalayarak lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır.



Sonuçta oluşan fenoksi radikali (A·) yeni bir serbest radikal oluşumunun başlatılmasını önlemeli veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar (AO)'lar çok iyi H⁺ ve e- vericileridir. Oluşan fenoksi radikali, aromatik halka etrafında çiftlenmemiş elektronların lokalizasyon değişiklikleri ile dengelenir [50].

2.4.1.3.2 Kafeik asit fenil etil ester (CAPE)

Propolisin ana bileşeni ve etken maddelerinden biri olan kafeik asit fenil etil ester (CAPE), reaktif oksijen türlerinin üretimini önlemektedir [42]. Yapıca flavanoidlere benzer ve iki halkasal yapı içerir. Bu halkasal yapılardan biri iki tane hidroksil (OH) grubu taşımaktadır. CAPE'ler, bu OH grupları sayesinde redoks reaksiyonlarında aktif rol oynayarak, E ve C vitamini gibi antioksidan özellik göstermektedirler [51].

Isı ile yanık oluşturulan bir deneyde, sıçanların plazmasındaki lipit peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeyleri üzerine propolisin, temel aktif bileşiklerinden olan CAPE'nin etkisi araştırılmıştır. CAPE eklenen grupta, SOD aktivitesinin azalmasının önlendiği [42], insan nötrofillerinde ise ksantin oksidaz aktivitesinin inhibe edilerek reaktif oksijen üretiminin tam olarak bloke edilmesiyle beraber, antioksidan etki gösterdiği [42,46], malondialdehit (MDA) ve nitrik oksit düzeylerinin düşürüldüğü tespit edilmiştir [42].

Propolislerin yapısında ayrıca glukoz, fruktoz ve sükroz gibi şekerler ve B₁, B₂, C ve E vitaminleri ile bakır, kurşun, gümüş, demir, molibden, alüminyum, silisyum, nikel, stransiyum, vanadium, magnezyum, çinko, manganez, civa, selyum, lantan, antimon gibi elementlerin de bulunduğu saptanmıştır [40-42].

Pek çok farklı coğrafyada, farklı bitkilerden toplanan ve birçok bileşiğin bitki öz suyundan hiçbir değişikliğe uğramadan yapısına katıldığı propolis için, en önemli kaynağın *Populus nigra* (karakavak) bitkisi olduğu düşünülmektedir [43,46]. Bunun yanında; bitki salgıları, *Pinus spp.* (Çam)'nin reçineleri, *Betula spp.* (Huş), *Populus spp.* (Kavak), *Aesculus hippocastanum* (Atkestanesi), *Salix spp.* (Söğüt), *Alnus spp.* (Kızılağaç), *Abies spp.* (Göknar), *Prunus spp.* (Erik), *Ulmus spp.* (Karaağaç), *Quercus spp.* (Meşe), *Fraxinus excelsior* (Dişbudak) vs. gibi türlerin de propolis kaynağı olduğu belirtilmiştir [52]. Propolis; bitki kaynaklı bir ürün olmasına rağmen bitkisel bir madde değildir. Propolis yapısına katılan maddeler; bitkilerin yaralı bölgelerinden çıkan salgı maddelerinde, yaprak tomurcuklarında ve yapraklardaki lipofilik maddelerinde de (müsilajlar, yapışkanlar, reçineler vs.) bulunmaktadırlar. Arılar, propolisi bitkilerin değişik kısımlarından salgılanan maddelerin yapılarını değiştirerek üretmektedirler [44].

2.4.2 Propolisin biyolojik özellikleri

2.4.2.1 Antimikrobiyal etkisi

Propolisin antimikrobiyal etkisi; bakteriler, virüsler, mantarlar ve bazı parazit canlılar üzerinde görülmektedir [39,52,53].

2.4.2.1.1 Antibakteriyel etkisi

Propolislerin antimikrobiyal etkisi, özellikle gram (+) koklar ile gram (-) basiller üzerinde gözlenmiştir [39,53]. Propolisin %13'lük ekstraktının *in vitro* olarak üst solunum yolu enfeksiyonuna neden olan ajanlara karşı, bakterisidal etki gösterdiği saptanmıştır [54].

Propolis ekstraktlarının, antibiyotiklerin aktivitesinde artış meydana getirdiği de gözlenmiştir [53,54]. Propolisin, *in vitro* olarak besiyerinde antibiyotiklerin etkisini arttırarak ve etki sürelerini uzatarak sinerjik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Böylece bir etkenin MIC (Minimum İnhibitory Concentration) değerini oluşturmada ve dolayısıyla verilmesi gereken antibiyotik dozunun belirlenmesinde ve azaltılmasında önemlidir [54].

Propolisin antibakteriyel etkisinin; pinosebrin, galanin, pinosilvin, pinobanksin gibi flavonoidler ile sinnamilidin, asetik asit, benzil kumarat ve kafeik asit esterlerine bağlı olduğu gözlemlenmiştir [53,54]. Bunların en önemlisi kafeik asit ve türevleridir [54].

2.4.2.1.2 Antiviral etkisi

Propolisin antiviral etkisi ile ilgili çok sayıda çalışmadan elde edilen birçok veri vardır. Çeşitli çözücülerle elde edilen özütlerle yapılan çalışmalara göre; influenza (grip hastalığı) A ve B virüsünün üremesine etki ettiği (üremeyi azalttığı), sağırlar arasında yaygın olan hastalık virüsüne ve Newcastle hastalığı (tavuklarda yaygın olan bir hastalık) virüsüne etki ettiği vurgulanmıştır. Ayrıca *in vitro* olarak poliovirüs, pikarnovirüs ve herpes virüslerine karşı da çok etkili olduğu tespit edilmiştir [53,54].

Pek çok RNA ve DNA virüslerine karşı antiviral aktivite sergileyen flavonoidler ve aromatik asit türevleri, propolisin faydalı olduğu düşünülen en önemli maddelerindendir [53,54]. Propolis içeriğinde bulunan bioflavonoidler, virüsün protein kılıfını tutarak, virüslerin enzim salgılamasını ve çoğalmasını önlerler [48]. Grip (influenza) virüsleri, kafeik asit gibi fenolik bileşiklere karşı zayıf hassasiyet göstermesine rağmen, DNA virüslerden olan polio ve para influenza virüslerinden daha hassastırlar [54].

2.4.2.1.3 Antifungal aktivitesi

Mellet Clerc ve arkadaşları (1987)'nin raporuna göre %5'lik konsantrasyonda karşılıklı etkileşen propolene glycolun varlığında propolisin, Mycroporum ve Trichophyton'a karşı önemli bir antifungal aktivite gösterdiği belirtilmiştir. *Candida albicans* mayalar üzerine, bazı antimikotik ilaçların propolisle (%10) birleşmesi sonucu, ilaçların aktivitesi artış göstermiştir. Çoğu türe karşı propolisin mükemmel derecede etkili olduğu görülmüştür. Vandes ve arkadaşları (1987); Küba'da üretilen 30 propolis ekstraktının, 17 fungal patojene karşı, antifungal aktivitesi (%10 etanolde) yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. EEP (propolisin etanol ekstraktı), *Candida* başta olmak üzere test edilen bütün cilt mantarlarını inhibe etmiştir [53].

2.4.2.1.4 Antiprotozoan aktivitesi

Scheller ve arkadaşları (1977); propolisin (EEP) antiprotozoan aktivitesini, *in vitro* olarak *Trichomonas vaginalis*'in 3 türünde rapor etmişlerdir. EEP çözeltileri, *in vitro* olarak kullanıldığında, 150 mg/ml konsantrasyonda türler üzerinde letal bir aktivite göstermiştir [53].

Propolisin antiprotozoan aktivitesini gözlemek amacıyla yapılan çalışmada; deney hayvanları *Eimoria manga*, *E. media* ve *E. perforans* ile enfekte edildikten sonra hayvanlara %3'lük EEP ve diğer antiprotozoan ilaçlar uygulanmış ve propolisin antiprotozoan etkisinin diğer ilaçlardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir [53].

2.4.2.2 Sitotoksik aktivitesi

Bazı doku kültürlerinde, farklı metodlarla, propolis ekstraktlarının *in vitro* sitotoksik aktivitesinin incelenmesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur [53].

Yapılan çalışmalarda, propolisin sitotoksik etkilerine kısmen cevap verebilen propolis bileşikleri, CAPE olarak tanımlanmıştır. İnsan kanser hücrelerinde, CAPE'nin etkileri meme (MCF-7) kanserinde ve melanoma hücre kültürlerinde test edilmiş ve sonuçta; melanoma, kolon ve renal kanser hücre hatlarında daha çarpıcı etkiler gözlenmiştir.

Fakat normal fibroblastlar ve melanositler üzerinde CAPE'nin etkisinin daha az olduğu gözlenmiştir. CAPE'nin transforme olmuş hücrelerde daha kolay etkili olmasının nedeninin, propolisin açıklanmış karsinostatik özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir [53].

Metil ferulat, metil asetil ferulat, metil asetil izoferulat ve metil cafeat gibi kafeik asit türevlerinin, antitümör aktiviteleri de Inayama ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. Bazı bilim adamlarına göre Çin hamster ovaryumunun kanserli hücre hattında propolisin *invitro* sitotoksik etkisi, propolisteki naftalin türevlerinden dolayı olduğu düşünülmektedir. İnsan karaciğer kanserinde, KB ve HeLa hücrelerinde Brezilya propolis ekstraktlarıyla yapılan *in vitro* testlerde, propolisin sitotoksik etkilerinin, propolis içeriğindeki kuersetin, kafeik asit ve fenil ester bileşiklerinden dolayı olduğu gösterilmiştir [53].

2.4.2.3 Antiinflamatuvar etkisi

Propolisin güçlü bir antiinflamatuvar etkisinin olduğu, propolisin çeşitli dozlarına bağlı olarak yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Propolisin antiinflamatuvar etkisinin meydana gelmesinde; trombositlerin bir araya gelmesinin önlenmesi sonucu prostoglandinler ve lökotrienler gibi ekzonoidlerin sentezinin engellenmesi ve histamin gibi inflamasyonda rol oynayan modülatörlerin salınmasının önlenmesi durumu öne sürülmüştür [54]. Propolis ekstraktının dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek, antiinflamatuvar etki gösterdiği de bildirilmiştir [53]. Formaldehit ile eklemlerde oluşturulan artrit karşı, propolis ekstraktının lokal olarak kullanılması sonucu, belirgin derecede antiinflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır [46].

2.4.2.4 Antioksidan özellikleri

Propolisin üzerinde durulan en yeni özelliklerinden birisi de antioksidan özelliğidir. Propolisteki temel bileşen olan flavanoidler ve türevlerinin, serbest radikalleri temizlemede, en çok etkili olan bileşikler olma özelliğine sahip oldukları kanıtlanmıştır. Bazı flavanoidler, doymamış yağ asitlerinin peroksi radikalleriyle reaksiyona girip temizleyici rol oynayarak, lipit peroksidasyonunun başlangıç aşamasına etki edebilirler.

Flavonoidlerin antioksidan etkilerinin; peroksit iyonları, H₂O₂, tekil oksijen ve lipit peroksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırabilme yeteneklerine göre olduğu düşünülmektedir. Flavonoidlerin, serbest radikalleri ortamdaki temizlemeleri ve uzaklaştırabilmeleri gibi işlevlerinin yanı sıra, lipo-oksijenaz ve siklo-oksijenaz enzimlerini inhibe ederek antioksidan etki gösterebilmeleri üzerinde de durulmaktadır [54].

Serbest radikal olarak adlandırılan oksidan moleküller, hücrede normal metabolizma esnasında üretilirler. Membran lipitlerinin oksidasyonu; lipit peroksidasyonuna ve onların sebep olduğu hasara yol açarlar. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GP) gibi enzimler savunma mekanizması sırasında üretilen enzimlerdir. Savunmada endojen antioksidan enzimlerin koruyucu etkilerine ek olarak, besinlerle alınan (ekzojen) antioksidanların tüketimi de büyük önem taşımaktadır. Besinsel temel antioksidanlar; E vitamini, C vitamini, karotenoidler, flavonoidler ve diğer polifenollerden oluşmaktadır. Özellikle savunma mekanizmasında hücredeki antioksidan enzimlerin (SOD ve GP gibi) önemi büyüktür ve bu enzimlerin yetersiz olması veya enzim aktivitelerinde meydana gelen azalmalar, hücre bileşenlerinde onarılamayacak hasarlara yol açabilirler. Ancak besinlere antioksidan katkıları yapıldığında, hücredeki savunma sistemi güçlendirilerek, hasar en aza indirgenebilmektedir. Propolis ve diğer antioksidan maddelerle yapılan çalışmalarda, propolisin lipit peroksidasyonunu engellediği ve serbest radikal oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir [39].

2.4.2.5 Antikarsinojenik etkisi

Propolisin en önemli biyolojik etkilerinden biri de karsinostatik etkisidir [54]. Propolisin yapısındaki CAPE, sinamik asit ve terpenoidlerin sitotoksik aktivitesinden dolayı; bağırsak, böbrek, meme, burun ve gırtlak kanserinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır [39,54]. Propolisin karsinostatik etkisinden sorumlu en önemli etken maddenin, özellikle CAPE olduğu düşünülmektedir. Yapılan bazı incelemelerde, CAPE'nin kültür ortamında transforme sıçan ve insan hücrelerinde apoptozisi uyararak, transforme hücrelerin gelişimini yavaşlattığı ve hücre seçici özelliğinden dolayı da, normal fibroblastlara karşı çok az etkili olduğu ya da hiç etkisinin olmadığı

gözlemlenmiştir. Buna ek olarak; CAPE'nin, insan tümör hücrelerinin birçoğunun çoğalmasını engelleyebildiği ve bu etkiyi, mutajenik uyaran tarafından indüklenen oksidatif süreci engelleyerek yapabildiği öne sürülmüştür [42].

2.5 Çalışılan Deney Hayvanı Hakkında Genel Bilgi

Pullu sazan (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) (Şekil 2.1); geniş bir coğrafik alana yayılmış, Avrupa, Asya, Afrika, Latin Amerika özellikle Brezilya ve Avustralya'da yetiştiriciliği yapılan bir tatlı su balığı türüdür. Ülkemiz sularında doğal olarak yaşayan bu tür, “adi sazan” veya “pullu sazan” şeklinde adlandırılmaktadır. Balıklandırma ve yetiştiricilikte kullanılan sazan özellikle “aynalı sazan”dır.

Sazanların baş ve sırt kısımları esmer yeşil, yanlar ise yeşilimsi sarı renktedir. Ağzlarında diş bulunmaz, sadece farinks dişleri vardır. Ağız kenarında bir çift kalın yüzgeç bulunmaktadır, diğer yüzgeçleri ise tektir. Vücutları kambur ve başları küçüktür. Böylece daha fazla et bağlama imkânına sahiptir [55].



Şekil 2.1 Pullu sazan (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758).

2.6 Çalışılan Dokular Hakkında Genel Bilgi

2.6.1 Karaciğer dokusunun yapı ve fonksiyonları

Karaciğer; vücudun hem arteriol hem de venöz kanı alan tek organıdır. Diğer organlara sadece arteriol kan gelir ve venöz kan gider. Karaciğere ise arteriol ve venöz kanın her ikisi de gelir, fakat sadece venöz kan gider.

Karaciğerin başlıca görevleri; safra salgısı üretmek, glikozu, glikojene çevirerek depolamak, çeşitli mineral ve vitaminleri depolamak, kanın pıhtılaşmasını sağlayan ve pıhtılaşmayı önleyen maddeler üretmek, ömrünü tamamlamış eritrositleri tahrip etmek, zehirli maddeleri zararsızlaştırmak, kan hücreleri üretmek, üre oluşturmak ve kan depolamaktır [56].

2.6.2 Solungaç dokusunun yapı ve fonksiyonları

Suda yaşayan çok hücreli hayvanların çoğu, solunum işlevini solungaçlar aracılığıyla gerçekleştirirler. Basitten gelişmişe kadar çeşitleri vardır. Solungaçlarda genellikle bol miktarda kılcak kan damarları bulunmaktadır. Suda erimiş oksijen, tek sıra halindeki kapiller endotelyumdan kana geçerek, kan pigmenti olan hemoglobin tarafından tutulur ve dolaşım sistemi vasıtasıyla vücudun her hücresine ulaştırılır.

Suda eriyen oksijen miktarı çok düşüktür ve deniz suyunun 100 hacminde, 0.5 hacim (% 0.5) oksijen bulunmaktadır. Havadaki oksijen miktarı % 21 oranındadır. Bu yüzden suda yaşayan canlıların oksijen ihtiyacını karşılayabilmeleri için, solungaçların devamlı sulu ortamda olması gerekmektedir [57].

2.6.3 Kas dokusunun yapı ve fonksiyonları

Balıkların derileri, diğer omurgalılarda olduğu gibi üst deri (epidermis) ve alt deri (dermis) şeklinde iki tabakadan oluşur. Epidermiste çok sayıda mukus bezleri bulunur. Balıklarda kayganlığa sebep olan bu mukus tabakası, çok miktarda su emebilen glikoproteinler içermektedir. Dermis tabakasında ise, yoğun bir bağ dokusu mevcuttur

ve çeşitli pigment hücreleri yer almaktadır. Bunun yanına “guanoforlar” adı verilen ve pigment içermeyen renk maddeleri de bulunabilir. Guanoforlar, parlak gümüş beyazı guanin kristali içerir. Pullar, dermis kökenlidir ve pulların sayıları büyüklüğüne ve tipleri ise balık türlerine göre değişebilir [58]. Deri, balıkların tadını, kokusunu ve muhafaza sürecini etkiler. Balık öldükten sonra derideki mikroflora hızla yayılır. Bu durum balıkların bozulmasını hızlandırmaktadır. Deride -10°C 'ye kadar (psikrofilik mikroorganizmalar) gelişim gösterebilen çok sayıda spor bulunur. Balıkların bozulmasında, derideki mikroorganizmaların haricinde bağırsaktaki bakteriler de önemli rol oynar [59].

Balıkların kas sistemi, omur sayısına eşit sayıda olan myomerlerden oluşmuştur [60]. Balıklardaki kas fibrilleri yapısal olarak sıcakkanlı canlıların kas fibrilleri ile aynıdır. Tek farkı uzunluklarıdır. Balıkların kas fibrilleri sıcakkanlı hayvanlarınkine kadar uzun değildir [61]. Myomerlerin kalınlığı myofibrillerin uzunluğunu belirler. Myomerler, bağ doku yapısındaki myospektrumlar tarafından bölümlere ayrılmıştır. Dik yönde ayrılanlara myospektrum, zigzaglı (transversal) formda ayrılanlara ise myocommata denir. Balıklara ısı işlem uygulandığında bağ doku jelatinize olacağı (eriyeceği) için kaslar (myomerler) blok segmentler şeklinde ayrılır [62].

2.6.4 Kan dokusunun yapı ve fonksiyonları

Balıklar, gelişmiş yapılı dört üyelilere (tetrapoda) göre daha az kan taşırlar. Alyuvarları (eritrositler) yuvarlak ya da ovaldir ve çekirdek bulundururlar. Yalnız birkaç teleost balıkta çekirdek olmadığına ilişkin bilgi yer almaktadır. Çapları genellikle kıkırdaklı balıklarınkinin yarısı kadardır. Bu nedenle sayıları kıkırdaklı balıklarınkine göre, 5-8 kat daha fazladır. Akyuvarları (lökositleri) yine gelişmiş omurgalılarıdaki gibidir. Bununla beraber gelişmiş omurgalılarıda tipik şekilli akyuvarlar olmasına karşın balıklarda çok defa ara formlar halinde görülürler [63].

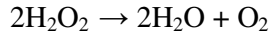
2.7 Dokularda Çalışılan Biyokimyasal Parametreler Hakkında Bilgi

2.7.1 Malondialdehit

Hücre lipitlerinin okside edilerek yapılarının bozulması sonucu oluşan ana bir metabolit olan MDA, lipit peroksidasyonu ürünlerinin %40'ını oluşturmaktadır. MDA; lipit peroksidasyonu sonucu, özellikle de doymamış yağ asitlerinin çift bağlarının oksidasyonu ile meydana gelir [64]. Bunun sonucunda; membran akışkanlığında azalma ile madde taşınımı fonksiyonlarında düzensizlikler meydana gelirken, membran geçirgenliği ve transmembran iyon gradientinde bozulmalar ortaya çıkar [65]. O₂⁻ radikali, doğrudan doymamış yağ asitleriyle tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna sebep olur. Birden fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin zarlarda fazla miktarda bulunmasından dolayı, lipit peroksidasyonu, zarlarda meydana gelen değişimlerin en önemli nedenidir [66]. Bu sebeple peroksidasyon sonucu oluşan MDA, lipit peroksidasyonunun bir indeksi olarak kabul edilmektedir.

2.7.2 Katalaz

Yapısında dört adet hem grubu bulduran bir hemoproteindir ve hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalar. Eritrositler büyük oranda katalaz içermektedir ve katalaz, aktivitesinin %98'ini eritrositlere borçludur.



Peroksidaz aktivitesi esnasında; enzim hidrojen peroksitlerden birini elektron verici bir substrat olarak, diğerini ise oksidan ve elektron alıcısı olarak kullanabilme özelliğini taşır [34].

2.8 Çalışılan Mikrobiyolojik Parametreler Hakkında Genel Bilgi

2.8.1 Psikrofilik bakteriler

Psikrofilik bakteriler daha çok su ve toprakta yaşama özelliğine sahip saprofit bakterilerden oluşur. Genellikle -8° ve 15°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilirler [67].

2.8.2 Mezofilik bakteriler

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalık yapan bakterilerin büyük bir kısmı bu gruptur ve 20° ve 45°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilirler. Bu bakteriler genellikle 37°C'de inkübe edilirler [67].

BÖLÜM III

MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Propolis ekstraktının hazırlanması

Balıkesir'in Kocaavşar köyü'nde bulunan arı çiftliğinden temin edilen propolisin etil alkol ekstraktı, %70'lik 100 ml etil alkol içerisine 30 gram propolis karıştırılması suretiyle hazırlandı. Bu karışım, 36 saat boyunca oda sıcaklığında, karıştırıcıyla tabla yardımıyla hazırlandı. Daha sonra elde edilen karışım, filtre kağıdı ile 2 kez süzüldü ve konsantr haldeki materyal evaporasyonla kurutulduktan sonra, kullanılabildiği kadar şişe içinde ışıktan korunarak 4⁰C'de saklandı.

3.1.2 Arsenik

Çalışmalarımızda, arseniğin trioksit formu (As₂O₃) kullanıldı. Arsenik trioksit (As₂O₃), su ile etkileştiğinde arsenit asidini (HAsO₂) veren bir bileşiktir. Özgül ağırlığı 3,87 gr/cm³'tür. Alkalilerde çözüldüğünde arsenit tuzlarını verir. Şiddetli bir zehirleyici özelliğe sahiptir [15].

3.1.3 Deneyde kullanılan kimyasal malzemeler

Deneyde kullanılan kimyasal malzemelerde Na₂CO₃ (Merck), NaOH (Merck), Na,K-tartarat çözeltisi (Merck), KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₂ (Merck), KCl (Potasyum klorür) (Merck), CuSO₄ (Merck), Folin Fenol Belirteci (Merck), BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma), H₂O₂ (Sigma), TCA (Trichloroacetic acid) (Merck), HCl (Merck), Pepton (Merck), Plate Count Agar (Labm), 2-thiobarbitirik asit (TBA) (Sigma), Tetraetoksipropan (TEP), MgO (Merck), H₂SO₄ (Merck) kullanılmıştır.

3.1.4 Deneyde kullanılan aletler

Deneyisel çalışmalar boyunca, otomatik pipetler, hassas terazi, vortex, soğutmalı santrifüj (Nuve NF-800-R), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601-UV), pH metre (PH 1000-masa tipi), derin dondurucu, manyetik karıştırıcı, homojenizatör (Ultra- Turrax T 25), su banyosu (Crifton), Olympus BH2 araştırma mikroskobu, Trade Raypa marka etüv kullanılmıştır.

3.1.5 Balıkların temini ve deneysel grupların hazırlanışı

Araştırma materyali olarak kullanılan pullu sazanlar (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758), Niğde Azatlı Barajı'ndan temin edildi. Uygulama öncesinde balıklar, 200 L'lik akvaryumlarda 10-15 gün boyunca düzenli olarak Excel pond marka pelet yemle beslenerek ortama adaptasyonları sağlandı. Deneyde ortalama 500-600 g ağırlığında balıklar kullanıldı. Her biri 8 adet balık içeren 4 grup oluşturuldu. İlk gruptaki balıklar kontrol grubu olarak kullanıldı. İkinci gruptaki balıklara 10 ppm propolis, üçüncü gruptaki balıklara ise 0.01 ppm arsenik [68], son grup olan dördüncü gruba ise 0.01 ppm arsenik ile birlikte 10 ppm propolis uygulandı. Canlılar 7 gün boyunca 7.4-7.8 pH'da 18-20 °C arası sıcaklıktaki suda bu uygulamalara maruz bırakıldı.

3.2 Metod

3.2.1 Diseksiyon işlemi ve doku numunelerinin hazırlanması

Uygulama yapılan balıklara hiçbir anestezi madde uygulanmadan direkt kuyruk kısımları kesilerek kaudal vena'dan kan örnekleri elde edildi ve daha sonra kanları alınan balıklardan sırasıyla analizler için karaciğer, solungaç ve kas dokusu örnekleri alındı.

3.2.2 Biyokimyasal ve hematolojik analizler için kan örneklerinin hazırlanması

Balıkların kanları alınmadan önce kan parametreleri üzerindeki olumsuz etkileri ve hücreleri hemoliz edici etkisinin olması nedeniyle, balıklara herhangi bir anestezi madde uygulaması yapılmadı [69-71].

Uygulama yapılan balıklardan kan, direkt canlı iken kuyruk kesme yöntemiyle alındı [5,7,70,72,73]. Kan alma işleminden önce balıklar kuru bir havlu ile silindi. Sonra keskin bir bıçak yardımıyla kuyruk yüzgecinin 1-2 cm gerisinden kesilerek, biyokimyasal analizler için ayırma jeli içeren cam tüplere 2 ml kadar alınan kan örneklerinin, sıcaklık farkı nedeniyle çabuk pıhtılaşmaması için, su sıcaklığına bağlı olarak belirlenen sıcaklıkta ayarlanabilen özel kaplara alındı. Laboratuara getirilen kan örnekleri, 3500 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve serum kısmı ayrılarak ependorf tüplere mikropipet yardımıyla aktarıldı ve böylece kan, biyokimyasal parametrelerin analizi için hazır duruma getirilmiş oldu.

Hematolojik analizler için, balıkların kaudal vena'larından 2 ml kadar alınan kan örnekleri direkt, içerisinde antikoagulan madde bulunan cam tüplere alındı [74]. Özellikle balıklarda pıhtılaşmayı önleyici madde olarak, heparin ve EDTA (Sodyum etilendiamin tetra asetik asit) kullanılmasının önerilmesi nedeniyle [7] çalışmada kan hücrelerinin uzun süre korunması için EDTA kullanıldı. Ayrıca balık kanının havayla temasından sonra, kısa süre içinde pıhtılaştığı için kan alma işlemi hızlı bir şekilde (30-45 sn) gerçekleştirildi.

3.2.3 Biyokimyasal çalışmalar için doku numunelerinin hazırlanması

Balıktan diseksiyon yöntemiyle karaciğer, solungaç ve kas dokuları çıkartıldıktan sonra elde edilen dokular, derin dondurucuda -40°C 'de muhafaza edildi. Dokular, lipit peroksidasyonu (MDA) ile total protein ve enzim (CAT) aktivitesinin belirlenmesi için iki parçaya ayrıldı. Lipit peroksidasyon analizleri için kullanılacak dokular 1/10 w/v oranında % 1,15'lik KCl (potasyum klorür) çözeltisinde homojenize edildi. Elde edilen bu homojenatlar analiz yapılmaya kadar -40°C 'de derin dondurucuda saklandı.

Enzimatik analizler için kullanılacak ikinci parçanın örnekleri öncelikle tartıldı ve 1/5 w/v oranında PBS tamponu (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi) (pH 7,4) eklenerek, buz izolasyonu altında Ultra Turrax homojenizatör kullanılarak homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler Nuve NF-800-R soğutmalı santrifüjde 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar hemen -40°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.4 Histopatolojik çalışmalar için numune hazırlanması

Deney hayvanlarından hasara uğratılmadan çıkarılan karaciğer, kas ve solungaç dokularından bir parça alınarak her biri ayrı ayrı doku takip kasetlerine konulduktan sonra % 10'luk nötral tamponlanmış formalin (NTF)'de 24 saat boyunca akan çeşme suyu altında fikse edildi. Fiksasyon sonrası dokular, alkol ve ksilen serilerinden geçirildikten sonra sıcak parafinde bekletildi. Parafinli dokular bloklandıktan sonra 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler lam üzerine yapıştırıldıktan sonra hematoxilen eozin (HE) boyama yapıldı.

3.2.5 Kas biyokimyası ve mikrobiyolojisi için doku numunelerinin hazırlanması

Kesim esnasında mikrobiyolojik analizler için balıklardan steril şartlarda 10'ar gram kas alınarak -20°C'de saklandı.

3.2.6 Protein tayini

Karaciğer, solungaç ve kas dokularından elde edilen süpernatantların 1 mL'sinde bulunan toplam protein miktarını belirlemek için Lowry yöntemi kullanıldı [75].

3.2.6.1 Kullanılan reaktifler

Protein tayini için kullanılan çözeltiler ve hazırlanışı şöyledir:

A çözeltisi:

%2'lik Na_2CO_3 'ın 0.1 N NaOH'teki çözeltisi: 100 hacim

%2'lik Na,K-Tartarat çözeltisi : 1 hacim

%1'lik CuSO_4 çözeltisi :1 hacim

A çözeltisi, yukarıda belirtilen üç çözeltinin belirtilen hacim oranlarıyla karıştırılmasıyla deneyin başlamasından hemen önce hazırlandı.

B çözeltisi:

Folin Fenol Belirteci : 1hacim

Bidistile su : 1 hacim

BSA çözeltisi:

Standart protein çözeltisi olan BSA (Bovine Serum Albumin) 1 mg/mL konsantrasyonda stok çözelti olarak hazırlandı. Örneklerin çalışılma aralığına göre 10, 20, 30,40,50,60,70,... mg/mL oranında BSA çözeltileri hazırlanarak kullanıldı.

3.2.6.2 Deneyin yapılışı

Proteinlerin tayini için aşağıdaki metod takip edildi:

Her deney için 2 kör, örneğin çalışma aralığına göre değişen konsantrasyonlarda BSA'lar ve örnek tüpleri hazırlandıktan sonra, bütün tüplere 2.5 mL A çözeltisi eklendi.

BSA tüplerine belirtilen hacimlerde BSA çözeltisi, örnek tüplerine ise deneyin şartlarına göre 5, 10, 20 µL'lik örnek çözeltileri deney tüpünün duvarına damlacıklar şeklinde bırakıldı.

Tüpler vorteksle iki defa karıştırılıp 10 dakika beklendi.

1: 1 oranında hazırlanmış olan Folin-fenol belirtecinden (B çözeltisi) 250 µL tüm tüplere eklendi. Tüpler yeniden iki defa vorteksle karıştırıldıktan sonra, renk oluşumu için 45 dakika karanlıkta bekletildi.

Bu sürenin bitmesinin ardından örnekler karanlık ortamdan alınıp, spektrofotometre kullanılarak örneklerin 695 nm'deki absorbans değişimi okundu.

3.2.6.3 Protein miktarının hesaplanması

Standart BSA çözeltileri ile hazırlanan kalibrasyon grafiği kullanılarak her bir örnek tüpündeki süpernatanın 1 mL'sinde bulunan protein miktarı hesaplandı.

3.2.7 CAT aktivite tayini

Katalaz enziminin tayini Luck yöntemi kullanılarak yapıldı [76].

3.2.7.1 Kullanılan reaktifler

Konsantrasyonu 1/15 M olan Na, K-fosfat tamponu (Na_2HPO_4 - KH_2PO_4) pH:7
Konsantre H_2O_2 çözeltisi

3.2.7.2 Deneyin yapılışı

160 µL H_2O_2 çözeltisi alınarak 100 mL Na, K-fosfat tampon çözeltisine ilave edildi. Bu hazırlanan çözeltilerden de 1000 µL alındı ve kör olarak kullanıldı. Örneklerin içeriğindeki katalaz miktarını belirlemek için, bu karışımdan 1000 µL alınarak küvete kondu ve üzerine çalışma aralığına göre 30 µL'den başlayarak gittikçe artan konsantrasyonlarda

süpernatant eklendi. Bir kez karıştırılarak spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda 30 saniye süreyle absorbans değişimi kaydedildi.

3.2.7.3 CAT aktivitesinin hesaplanması

Okunan absorbans değişimlerinden μL 'deki enzim ünite sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$C = \frac{\Delta\text{OD} \times 1\text{dk} \times 1000}{0.036 \times \mu\text{L süpernatant}}$$

3.2.8 Lipit peroksidasyonunun belirlenmesi

Metabolizma sonucu oluşan serbest radikallerin, hücre zarında bulunan lipitlere saldırması sonucu lipit peroksidasyonu gerçekleşmektedir. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarı ise Beuge J.A [77] yöntemi ile ölçüldü.

3.2.8.1 Kullanılan reaktifler

%5'lik TCA çözeltisi : 1 hacim

%0,375'lik TBA çözeltisi : 1 hacim

%0.25 N'lik HCl çözeltisi : 1 hacim

Belirtilen bu 3 çözeltinin hassas bir şekilde hazırlanması ve karşılarında belirtilen hacimlerde karıştırılmasıyla bir çözelti hazırlandı.

3.2.8.2 Deneyin yapılışı

1. 10 mL'lik santrifüj tüplerine, hazırlanan çözeltiden 4 mL eklendi.
2. Kör tüpleri haricinde diğer örnek tüplerine homojenattan 1 mL eklendi.
3. Şiddetli bir şekilde 1 defa karıştırıldı.
4. 15 dakika kaynar suda ($95-100^{\circ}\text{C}$ 'de) bekletildi.

5. Kaynar sudan çıkarılan tüpler soğutuldu ve 10 dakika boyunca 13500 rpm' de santrifüj edildi.
6. Elde edilen süpernatanın 535 nm'deki absorbanı spektrofotometrede okundu.

3.2.8.3 MDA düzeyinin hesaplanması

MDA miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

MDA- TBA kompleksi için molar absorban katsayısı: $\epsilon : 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$C = \text{OD} / 1.56 \times 10^5 \times \text{Total Hacim} / \text{Numune Hacmi}$$

3.2.9 Kas dokusunun histopatolojik analizi

NTF'deki fiksasyon işlemleri tamamlanmış olan doku numuneleri, akan çeşme suyunda 24 saat boyunca yıkandıktan sonra %70'lik, %80'lik, %95'lik ve absolut etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Tüm örnekler dehidratasyonu takiben toplam 1.5 saat süre ile ksilolde şeffaflaştırıldı ve daha sonra 60°C'de erimiş olan parafine konuldu. Erimiş parafinde 6 saat bekletilen dokular, parafin içine gömülerek bloklandı. Mikrotom ile parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler lamellere alındı. Genel histolojik yapıyı gözlemek için alınan kesitlere HE boyama yöntemi uygulandı. Hazırlanan bu kas dokusu preparatları araştırma mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi [78,79,80].

3.2.10 Karaciğer dokusunun histopatolojik analizi

NTF'deki fiksasyon işlemleri tamamlanmış olan doku numuneleri, akan çeşme suyunda 24 saat boyunca yıkandıktan sonra %70'lik, %80'lik, %95'lik ve absolut etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Tüm örnekler, dehidratasyonu takiben toplam 1.5 saat süre ile ksilolde şeffaflaştırıldı ve daha sonra 60°C'de erimiş olan parafine konuldu. Erimiş parafinde 6 saat bekletilen dokular, parafin içine gömülerek bloklandılar. Mikrotom ile parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler lamellere alındı. Genel histolojik yapıyı gözlemek için alınan kesitlere HE boyama yöntemi

uygulandı. Hazırlanan bu karaciğer dokusu preparatları araştırma mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi [78,79,80].

3.2.11 Solungaç dokusunun histopatolojik analizi

NTF'deki fiksasyon işlemleri tamamlanmış olan doku numuneleri, akan çeşme suyunda 24 saat boyunca yıkandıktan sonra %70'lik, %80'lik, %95'lik ve absolut etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildiler. Tüm örnekler dehidratasyonu takiben toplam 1.5 saat süre ile ksilolde şeffaflaştırıldı ve daha sonra 60°C'de erimiş olan parafine konuldu. Erimiş parafinde 6 saat bekletilen dokular, parafin içine gömülerek bloklandılar. Mikrotom ile parafin bloklardan 4-6 µm kalınlığında kesitler lamellere alındı. Genel histolojik yapıyı gözlemek amacı ile alınan kesitlere HE boyama yöntemi uygulandı. Hazırlanan bu solungaç dokusu preparatları araştırma mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi [78,79,80].

3.2.12 Eritrositlerin morfolojik analizi

Kandaki eritrositlerin morfolojilerinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığını tayin etmek için yayma preparat (froti) yöntemi kullanılmıştır [80,81].

Temiz lamın ucuna çok fazla büyük olmayan bir kan damlası konuldu. Bir diğer lam veya lamelle 45⁰ açı yapacak şekilde damla üzerine getirilip şekil değişmeksizin lam üzerine değdirildi ve lam boyunca çabucak geriye doğru kaydırıldı.

Lam özenle havada sallanarak olabildiğince çabuk kurutuldu. Üzerini örtecek şekilde metil alkol dökülerek 2-3 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra giemsa boyası ile 40 dakika boyandıktan sonra boyanın fazlası hafif akan çeşme suyunda yıkayıp kurutulduktan sonra mikroskopta incelendi.

3.2.13 Kas dokusunun mikrobiyolojik ve biyokimyasal analizi

3.2.13.1 Kas dokusunun mikrobiyolojik analizleri

Beslenmek için ideal bir gıda olan balık kas dokusu, mikroorganizmaların gelişmesi için de uygun bir ortamdır [82]. Balık kas dokusundaki toplam mikroorganizma sayısı balık etinin tazeliği ile orantılı olarak değişim göstermektedir. Balık kas dokusunun birim ağırlığındaki mikroorganizma sayısının artması, etin tazeliğinin azaldığını gösterir. 1 g balık etindeki mikroorganizma koloni sayısı 100.000'den az ise et tüketilebilir halde, 100.000' den fazla ise bozulmuş kabul edilir [83].

3.2.13.1.1 TMAB sayımı

Toplam mezofilik aerobik bakteri sayımı için PCA dökme plak yöntemi uygulandı. 10 g örnek Waring Blender'de 90 ml serum fizyolojik su (% 0.85 NaCl) ile homojenize edildikten sonra % 0.1 steril peptonlu su ile 10^1 , 10^6 dilüsyonları hazırlanıp standart Plate Count Agar'a dökme plak yöntemine göre ekimler yapıp, 35 °C'de etüvde 2 gün boyunca inkübasyona bırakıldı ve sonuçta plaklarda 20-200 arası koloni üremesiyle, mezofil bakterilerin sayımları yapıldı [84].

3.2.13.1.2 PB sayımı

Psikrofilik bakteri sayımı yine PCA dökme plak yöntemine göre yapıldı. 10 g örnek Waring Blender' de 90 ml serum fizyolojik su (% 0.85 NaCl) ile homojenize edildikten sonra % 0.1 steril peptonlu su ile 10^1 , 10^6 dilüsyonları hazırlanıp, standart Plate Count Agar'a dökme plak yöntemine göre ekimler yapıp 8- 10°C'de buzdolabında 10 gün inkübasyona bırakıldı. Sonuçta plaklarda, 20-200 koloni kadar üreyen psikrofil bakterilerin sayımları yapıldı [84].

3.2.13.2 Kas dokusunun biyokimyasal analizleri

3.2.13.2.1 MDA tayini

Lipit peroksidasyonu göstergesi olan [85] MDA tayini Schormüller (1969)'in [86] önerdiği metoda göre yapıldı.

Lipit oksidasyon derecesinin tespiti için 2-thiobarbütirik asit yöntemi uygulandı. 10 g örnek 4 N HCl ile asitlendirilerek Waring Blender'de homojenize edilip, üzerine birkaç damla köpük kırıcı ilave edilerek distilasyon işlemi uygulandı ve distilasyon ünitesinin altına ölçü silindiri konulup, 50 ml distilat toplandı. Toplanan distilattan 5 ml örnek tüpe alınarak 5 ml 0.02 M 2-thiobarbütirik asit reaktifi ilave edildi. Daha sonra tüpler sıkıca kapatılarak sıcak su banyosunda 35 dakika beklettikten sonra soğutulup 530 nm'de spektrofotometre'de absorbansı okundu. Spektrofotometrik ölçüm sonucu daha önce hazırlanmış olan tetraetoksipropan (TEP) eğrisi yardımıyla belirlenen katsayı ile çarpılarak malondialdehit (MDA) düzeyi mg/kg şeklinde saptandı.

3.2.13.2.2 TVB-N tayini

Balık dokularında meydana gelen kimyasal değişikliklerin en önemli özelliklerinden birisi uçucu bazların üretimidir ve bozulma seviyelerinin anlaşılmasında kullanılmaktadır. Toplam Uçucu Bazik Azot (TVB- N) tayini Schormüller (1968)'e [87] göre belirlendi.

Waring Blender'de homojenize edilen 10 g örneğe, alkalileştirme amacıyla 2 g MgO ve 1-2 ml köpük kırıcı ilave edilip, balon içeriği destilasyona bırakıldı ve içerisinde 0.1 N H₂SO₄ bulunan balonda toplanan destilat 0.1 N NaOH ile titre edildi.

3.2.13.2.3 Laktik asit tayini

Laktik asit miktarı; Keller ve ark.'nın [88] belirttiği titrasyon yöntemi ve dijital büret (50 ml) yardımıyla saptandı. Asitlik tayini ise, Waring Blender'de saf su ile homojenize edilen örneğin, 0.1 N NaOH ile pH'nın 8.3'e ayarlanması şeklinde uygulandı.

3.2.13.2.4 pH tayini

Ockerman'ın [89] belirttiği şekilde ve 'HANNA pH 211' (HANNA Instruments) pH metre cihazı ile ölçüldü. 10 g örnek 100 ml distile su ile Waring Blender'de homojenize edilip, pH metre'nin probu çözelti içerisine daldırılarak okuma yapıldı.

3.2.14 Kan dokusunun biyokimyasal analizleri

Balıklardan 2'şer ml jelli tüplere alınan kanlar, 3000 g'de 5 dk 4⁰C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kandan ayrılan serumlar ependorf tüplere alındı ve biyokimyasal analizler için hazır hale getirildi. Serumlardan otoanalizör cihazı yardımıyla; albumin (ALB), Alkalen fosfataz (ALP), Alanin aminotransferaz (ALT), Amilaz (AML), Aspartat aminotransferaz (AST), Globulin (GLOB), Glukoz, Kreatinin (CK), Laktat dehidrogenaz (LDH), Total Protein (TP), Trigliserit, Üre, VLDL, Ca (Kalsyum), Cl (Klor), P (Fosfor), K (Potasyum), Na (Sodyum) seviyeleri tespit edildi.

3.2.15 Kan dokusunun hematolojik analizleri

Biyolojik ve çevresel faktörlerin etkisi nedeniyle bir organizmada meydana gelebilecek çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin tümü hemopoyetik sistemle bağlantılıdır. Kan dokusunun fiziksel ve kimyasal yapısı, canlıda meydana gelen değişiklikleri doğru olarak yansıtmaktadır. Buna bağlı olarak deneylerde, arsenik ve propolis uygulanmış sazanlarda, hematolojik parametrelerde meydana gelebilecek değişikliklerin tayin edilmesi amacıyla, anestezi madde uygulanmadan balıkların kaudal venalarından direkt 2 ml kadar kan EDTA'lı tüplerde alındı.

Eritrosit ve trombosit sayıları için; kan önce Hayem çözeltisinde 1/200 oranında sulandırıldı ve sayım 40'luk objektifte yapıldı. Thoma lamında toplam 5 orta kare (80 küçük kare) sayılarak, direkt 10⁴ çarpanla mm³/10⁶'deki eritrosit sayıları tespit edildi.

Lökosit sayısı için alınan kan, Turck çözeltisinde 1/10 kez sulandırıldıktan sonra sayım 40'lık objektifte yapıldı. Bütün orta kareler (400 küçük kare) sayıldı ve direk 10^2 çarpanla $\text{mm}^3/10^4$ 'deki toplam lökosit sayısı belirlendi [90].

Hemoglobin miktarı; cyan-methemoglobin yöntemiyle (1mL Drabkin çözeltisi- 20 μ L kan karışımı 10 dk oda sıcaklığında bekletilir) tespit edildi. Karışımın absorbanı 540 nm'de okundu. Önceden hazırlanmış standart (Kit. 525 A, sigma) tablodan değerler hesaplandı [91].

Hematokrit miktar tayini ise, mikrohematokrit yöntemiyle yapıldı. Mikrohematokrit pipetlerine alınan kan numuneleri 5000 rpm de 4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Hematokrit değeri, santrifüj sonrası toplam kanın plazmaya oranı (%) olarak hesaplandı [90].

3.2.16 Verilerin İstatistiksel Analizi

Elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları, tek yönlü varyans analizinde Duncan's modeline göre SPSS paket programı aracılığı ile yapıldı.

BÖLÜM IV

BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Dokularında Ölçülen CAT Aktiviteleri

4.1.1. Kas dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri

Çalışılan kas dokularında CAT aktivitesi, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.1). Arsenik+propolis ve propolis gruplarının kas dokularındaki CAT aktiviteleri arsenik grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.1). Kontrol grubu CAT aktivitesine göre propolis uygulama grubu değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen CAT aktiviteleri

GRUPLAR	CAT ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	2.06 \pm 0.12 ^a
Propolis	1.96 \pm 0.14 ^a
Arsenik+Propolis	1.46 \pm 0.13 ^b
Arsenik	0.80 \pm 0.11 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata ($n=8$) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.1.2. Karaciğer dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri

Çalışılan karaciğer dokularında CAT aktivitesi, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.2). Arsenik+propolis grubunun CAT aktivitesi, arsenik grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.2). Propolis grubu CAT değerleri, arsenik ve arsenik+propolis grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.2). Kontrol ve propolis uygulama

grubu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Deneyde kullanılan pullu sazanların karaciğer dokularında ölçülen CAT aktiviteleri

GRUPLAR	CAT ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
Kontrol	45.53 \pm 1.45 ^a
Propolis	44.11 \pm 1.12 ^a
Arsenik+Propolis	37.83 \pm 0.78 ^b
Arsenik	21.49 \pm 1.22 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata ($n=8$) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.1.3. Solungaç dokusunda ölçülen CAT aktiviteleri

Çalışılan hayvanların solungaç dokularında CAT aktivitesi, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.3). Arsenik+propolis ve propolis gruplarının solungaçlarındaki CAT aktiviteleri arsenik grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.3). Kontrol grubu ve propolis uygulama gruplarının CAT aktiviteleri arasında ise istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 Deneyde kullanılan sazanların solungaç dokularında ölçülen CAT aktiviteleri

GRUPLAR	CAT ($\mu\text{mol/ mg protein}$)
Kontrol	1.59 \pm 0.08 ^a
Propolis	1.56 \pm 0.06 ^a
Arsenik+Propolis	1.26 \pm 0.04 ^b
Arsenik	0.87 \pm 0.02 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.2. Çalışma Gruplarının Dokularında Ölçülen MDA Düzeyleri

4.2.1. Kas dokusunda ölçülen MDA düzeyleri

Çalışılan kas dokularında MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis gruplarında istatistiksel olarak anlamlı artışlar vardır (P<0.05) (Çizelge 4.4). Arsenik+propolis ve propolis grupları kas dokularında MDA düzeyleri, arsenik grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir şekilde azalmıştır (P<0.05) (Çizelge 4.4). Propolis grubu kas dokusu MDA seviyelerinde meydana gelen değişimler kontrol grubu değerlerine göre önemli bulunmamıştır (P>0.05) (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen MDA düzeyleri

GRUPLAR	MDA (nmol/protein)
Kontrol	1.13±0.09 ^c
Propolis	1.25±0.10 ^c
Arsenik+Propolis	1.85±0.12 ^b
Arsenik	3.29±0.27 ^a

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.2.2. Karaciğer dokusunda ölçülen MDA düzeyleri

Çalışılan karaciğer dokularının MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır (P<0.05) (Çizelge 4.5). Arsenik+propolis ve propolis gruplarında MDA düzeyleri, arsenik uygulama grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir (P<0.05) (Çizelge 4.5). Propolis grubu MDA düzeyleri arsenik+propolis grubuna göre istatistiksel olarak azalmış (P<0.05), kontrol ve propolis uygulama grupları MDA seviyeleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmemiştir (P>0.05) (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 Deneyde kullanılan pullu sazanların karaciğer dokularında ölçülen MDA düzeyleri

GRUPLAR	MDA (nmol/protein)
Kontrol	0.18±0.02 ^c
Propolis	0.19±0.03 ^c
Arsenik+Propolis	0.24±0.02 ^b
Arsenik	0.54±0.05 ^a

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.2.3. Solungaç dokusunda ölçülen MDA düzeyleri

Çalışılan solungaç dokuları MDA düzeylerinde; arsenik ve arsenik+propolis gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır ($P<0.05$) (Çizelge 4.6). Arsenik+propolis ve propolis gruplarında MDA düzeyleri, arsenik grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.6). Propolis grubu solungaç dokularının MDA düzeyleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir değişim gözlenmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Deneyde kullanılan pullu sazanların solungaç dokularında ölçülen MDA düzeyleri

GRUPLAR	MDA (nmol/protein)
Kontrol	1.63±0.13 ^c
Propolis	1.79±0.21 ^c
Arsenik+Propolis	2.14±0.18 ^b
Arsenik	2.89±0.23 ^a

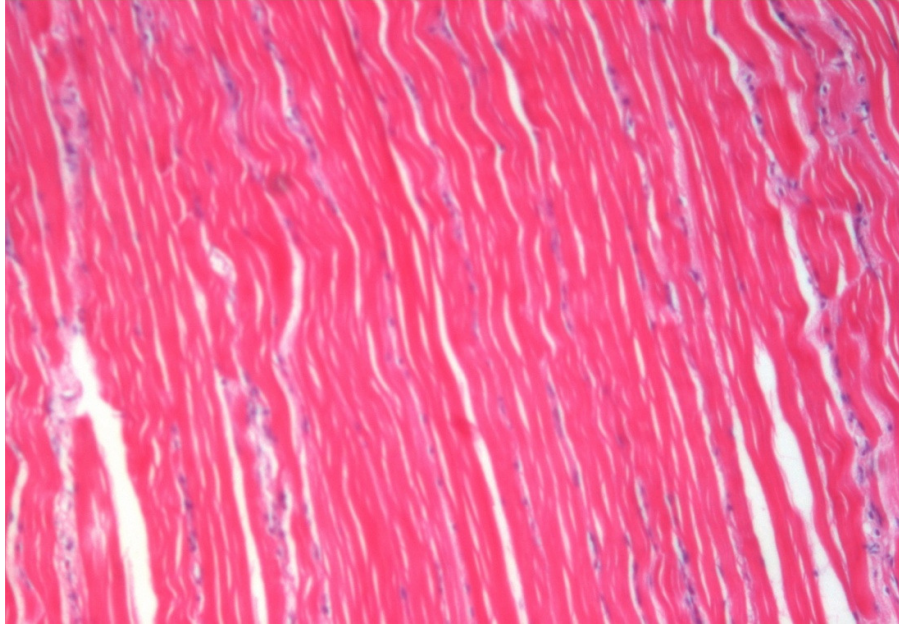
[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.3. Çalışma Gruplarının Dokularında Meydana Gelen Histopatolojik Değişimler

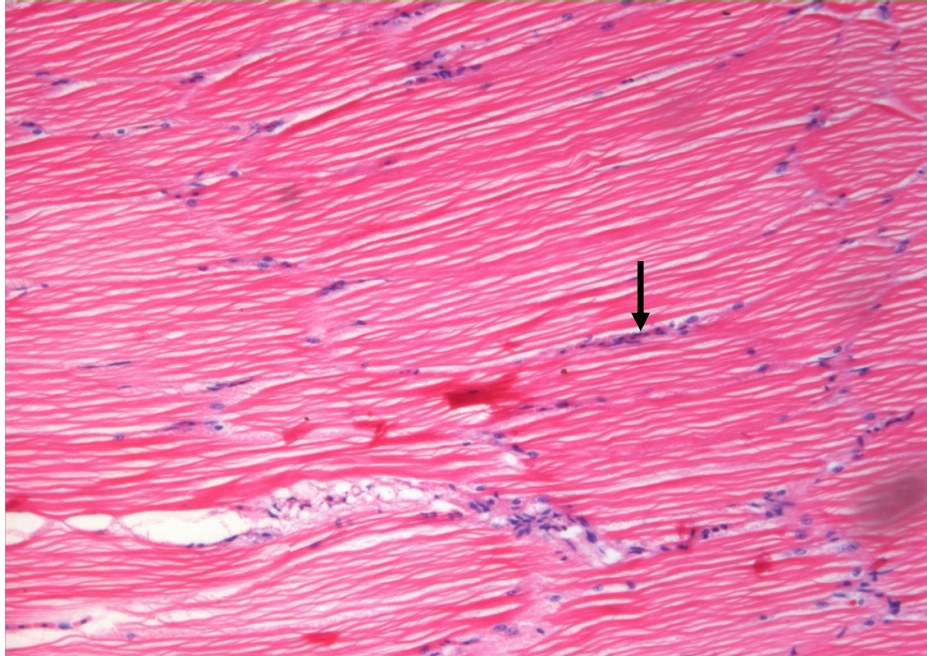
4.3.1 Kas dokularının histopatolojik sonuçları

Sazan balıklarında kontrol grubu ve 7 gün süreyle 0.01 ppm arsenik, 10 ppm propolis ve 0.01 ppm arsenik ve 10 ppm propolis uygulaması sonucu kas dokusunda meydana gelen histopatolojik değişimler şekil 4.1 ve 4.4.'te gösterilmiştir.

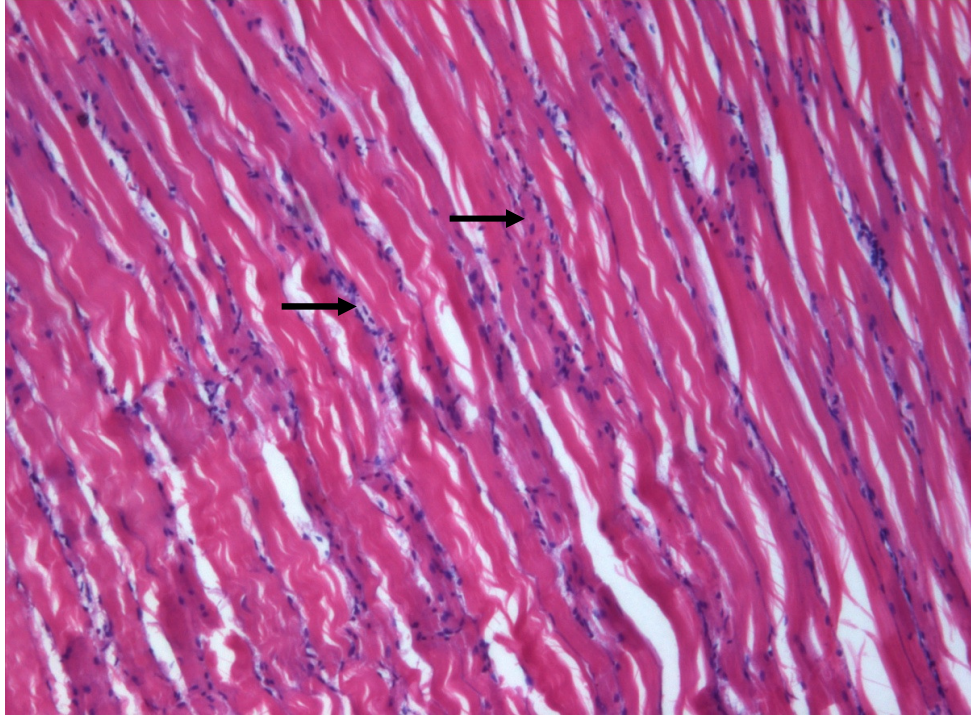
Kas dokularının histopatolojik analizi yapıldığında; kontrol grubu normal görünüme sahip iken (Şekil 4.1), propolis (Şekil 4.2), arsenik (Şekil 4.3) ve arsenik+propolis (Şekil 4.4) uygulama gruplarında nükleer proliferasyon tespit edilmiştir.



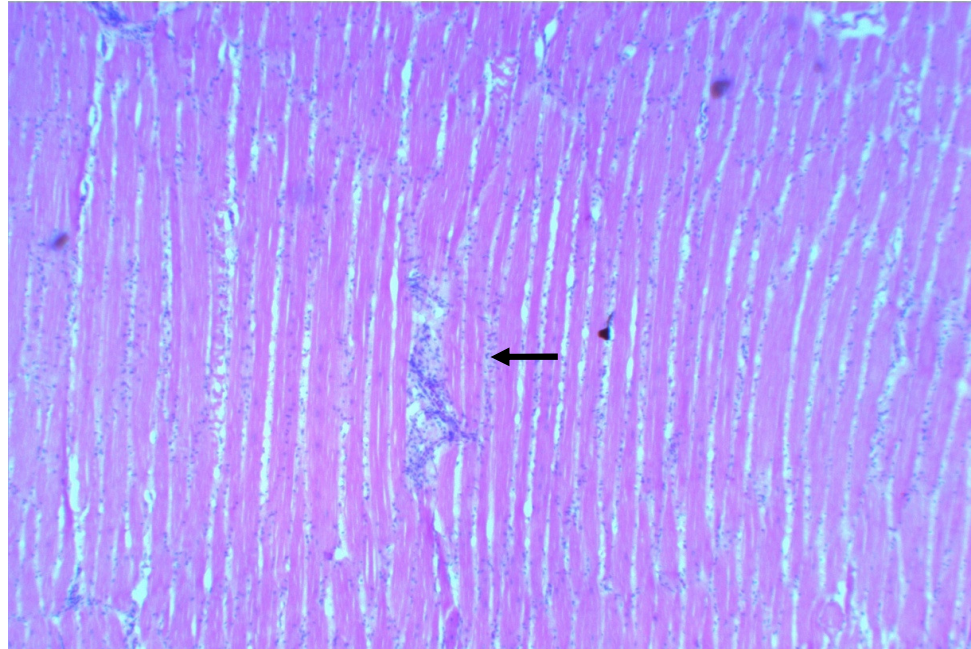
Şekil 4.1 Kontrol grubu kas dokusunun normal histolojik görünümü (HEx100)



Şekil 4.2 Propolis grubu kas dokusu kesitlerinde histopatolojik görünüm, nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100)



Şekil 4.3 Arsenik grubu kas doku kesitlerinde histopatolojik görünüm, nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100)

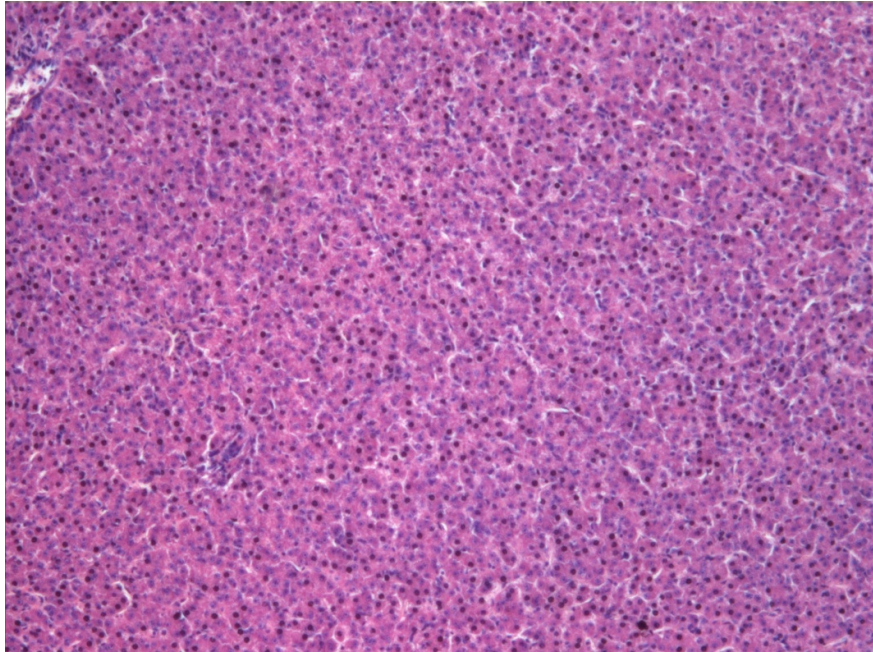


Şekil 4.4 Arsenik+propolis grubu kas dokusu kesitlerinde histopatolojik görünüm, nükleer poliferasyon (oklar) (HEx100)

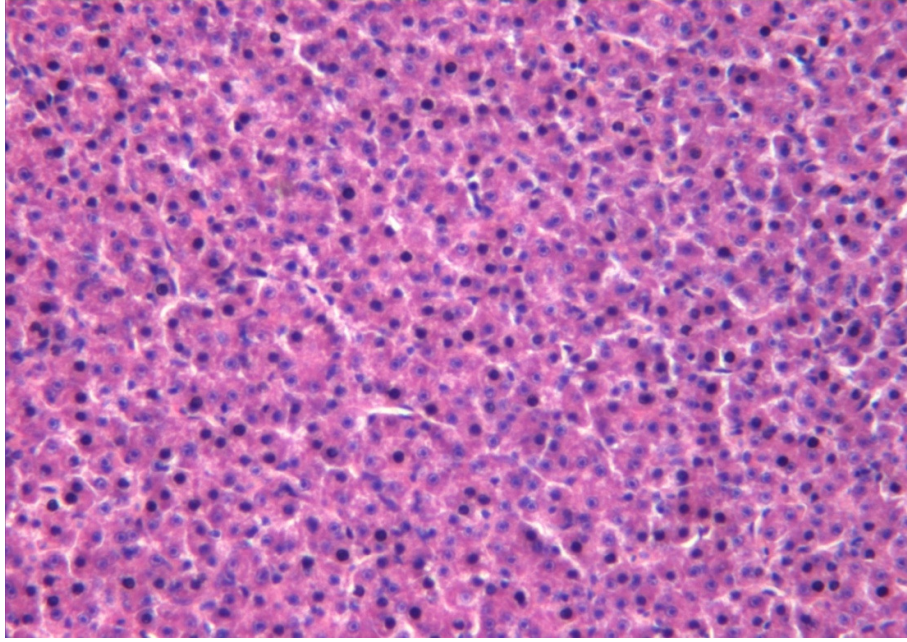
4.3.2 Karaciğer dokularının histopatolojik sonuçları

Kontrol grubu ve uygulama grupları (yedi gün süreyle 0.01 ppm arsenik, 10 ppm propolis ve 0.01 ppm arsenik+10 ppm propolis) pullu sazan karaciğer dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler şekil 4.5-4.12'de gösterilmiştir.

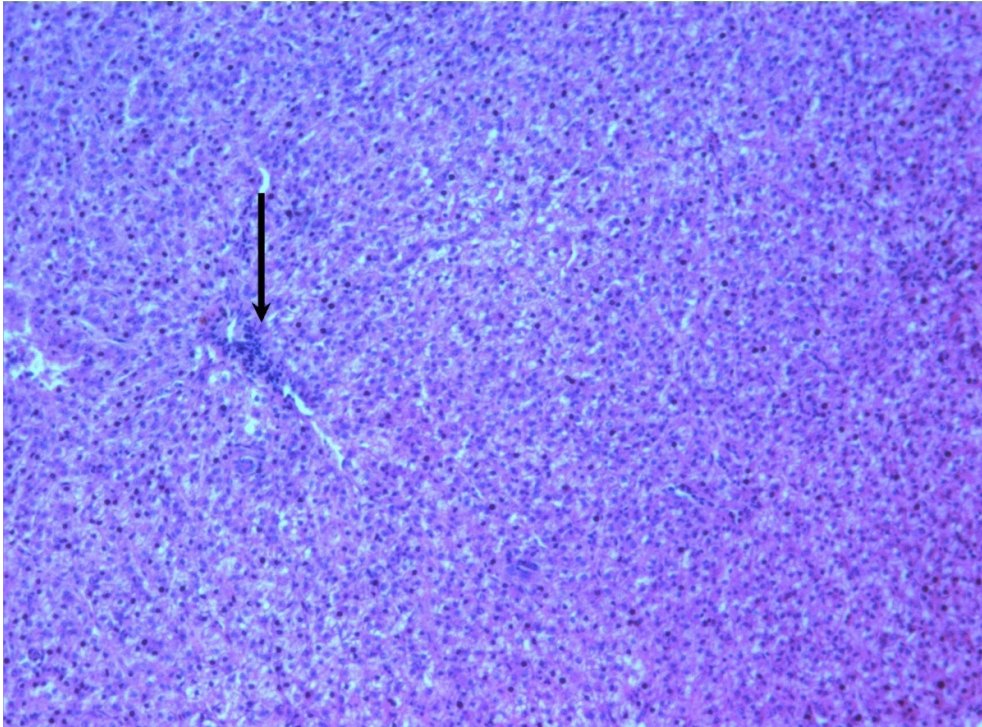
Kontrol grubunda bulunan pullu sazanların karaciğer dokuları normal görünüme sahip iken (Şekil 4.5, 4.6), propolis uygulama grubunda yer alan pullu sazanların karaciğer dokularında mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 4.7, 4.8) gözlenirken, arsenik uygulanan grupta konjesyon (Şekil 4.9, 4.10-A), hidrofik dejenerasyon (Şekil 4.9, 4.10-B) ve mononükleer hipertrofi (Şekil 4.9, 4.10-C) dikkat çekmiştir. Arsenik+propolis uygulama grubunda ise konjesyon (Şekil 4.11, 4.12-A) ve hidrofik dejenerasyon saptanmıştır (Şekil 4.11, 4.12-B).



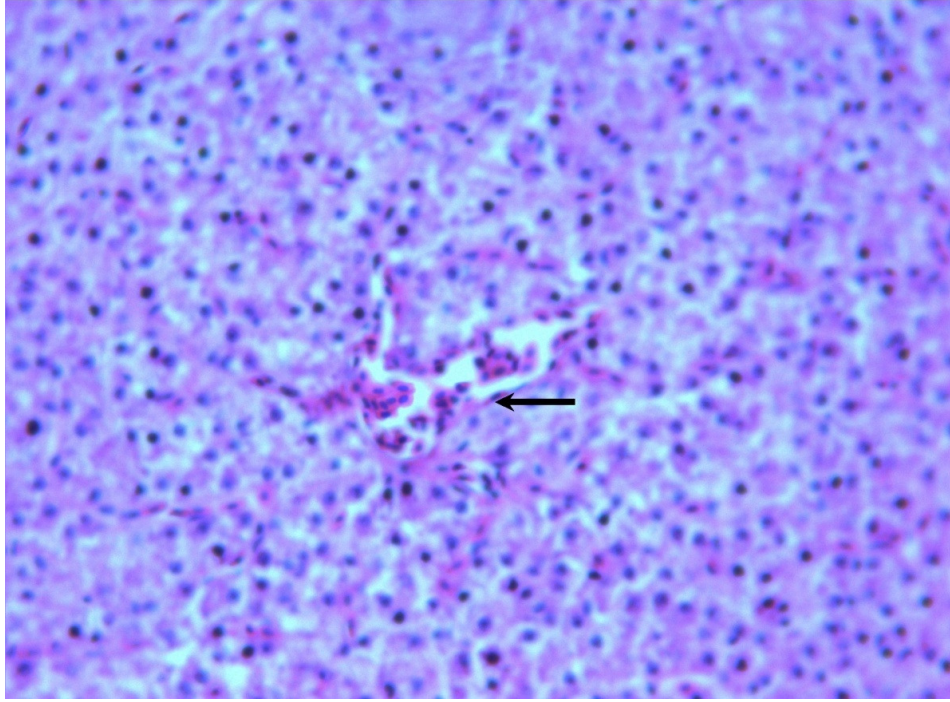
Şekil 4.5 Kontrol grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü, normal hepatositler (HEx100)



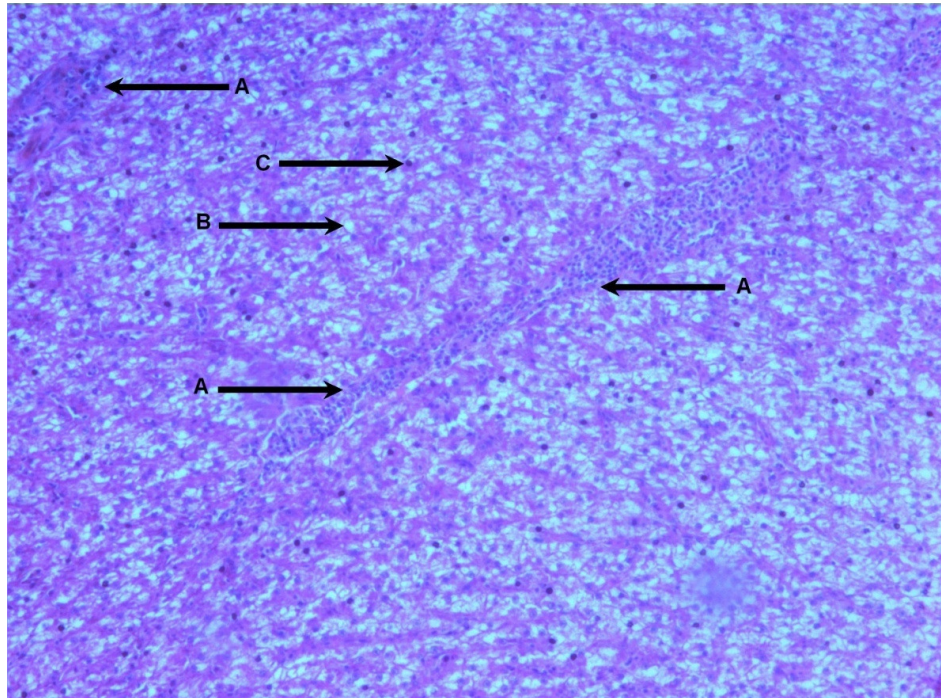
Şekil 4.6 Kontrol grubu karaciğer dokusunun histolojik görünümü, normal hepatositler (HEx200)



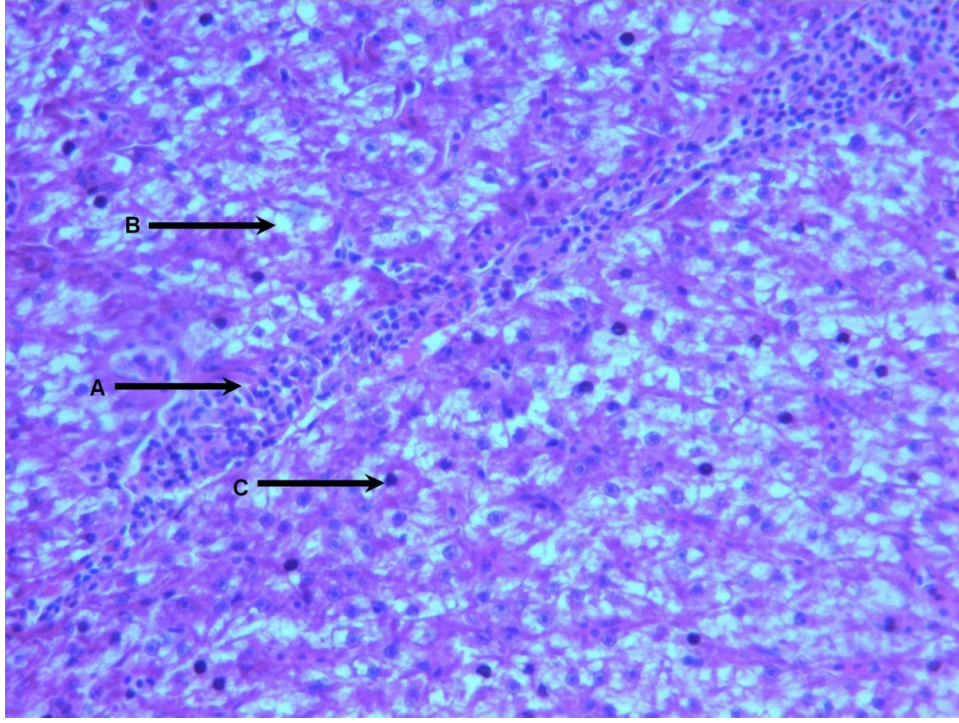
Şekil 4.7 Propolis uygulama grubu karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm, mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (HEx100)



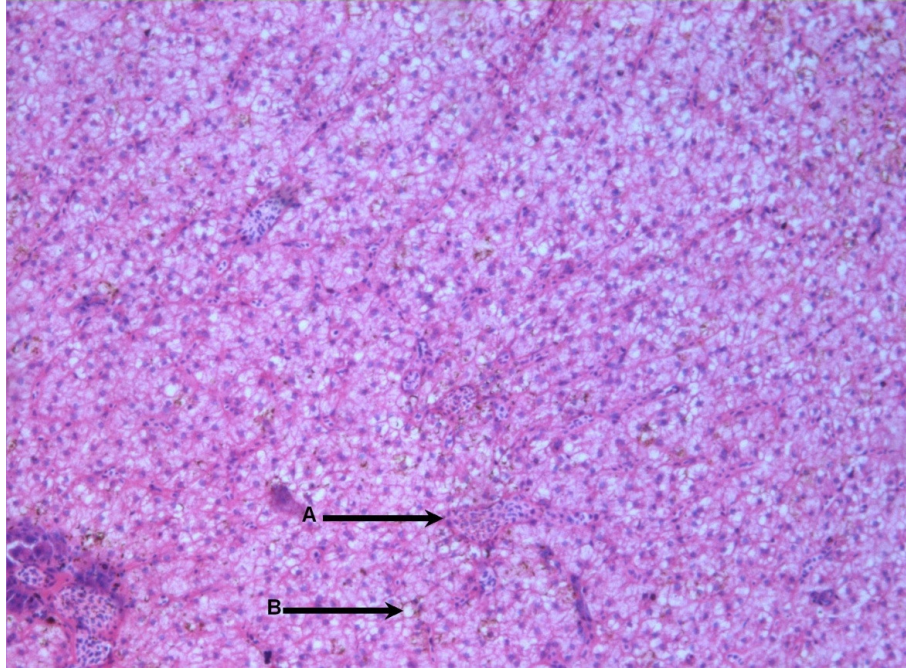
Şekil 4.8 Propolis uygulama grubu karaciğer doku kesitlerinde normal histopatolojik görünüm, mononükleer hücre infiltrasyonu (oklar) (HEx100)



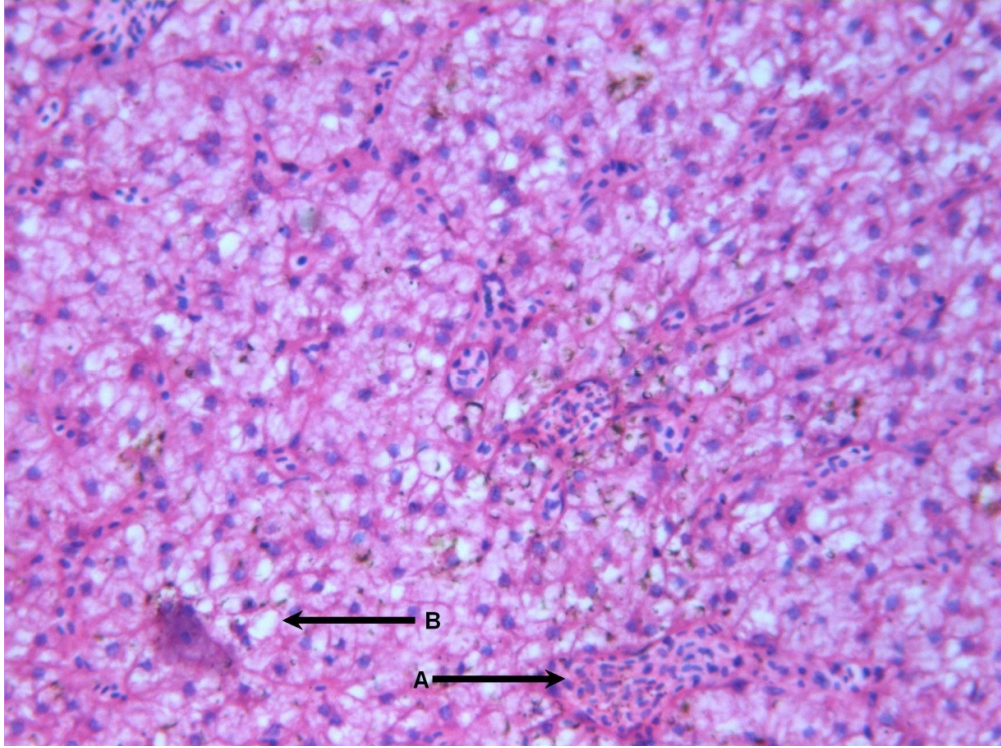
Şekil 4.9 Arsenik grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm; A-Konjesyon B- Hidrofik dejenerasyon ve C- Mononükleer hipertrofi (HEx100)



Şekil 4.10 Arsenik grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm
A- Konjesyon B- Hidrofik dejenerasyon ve C- Mononükleer hipertrofi
(HEx200)



Şekil 4.11 Arsenik+propolis grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm
A- Konjesyon ve B- Hidrofik dejenerasyon (HEx100)



Şekil 4.12 Arsenik+propolis grubu karaciğer doku kesitlerinde histopatolojik görünüm.
A- Konjesyon ve B- Hidrofik dejenerasyon, (HEx200)

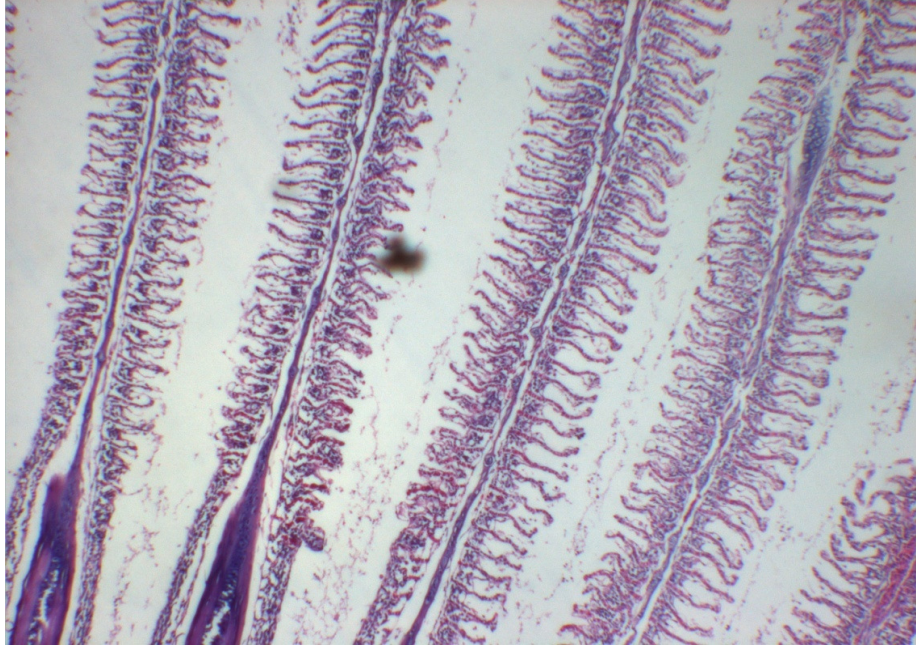
4.3.3 Solungaç dokularının histopatolojik sonuçları

Kontrol grubu ve 7 gün süreyle 0.01 ppm arsenik, 10 ppm propolis ve 0.01 ppm arsenik ve 10 ppm propolis uygulaması sonucu *Cyprinus carpio* solungaç dokularında meydana gelen histopatolojik değişimler şekil 4.13-4.19'da gösterilmiştir.

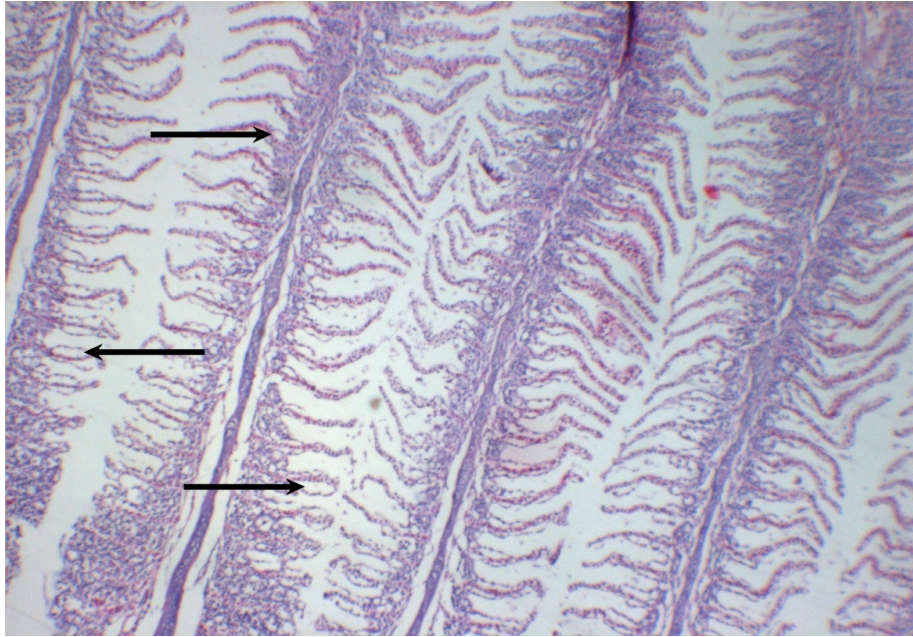
Kontrol grubuna ait hayvanların solungaç dokuları normal görünümüne sahip iken (Şekil 4.13) propolis uygulama grubunda ise solungaçlarda yer yer vakuol oluşumunun meydana geldiği dikkat çekmektedir (Şekil 4.14,4.15). Arsenik uygulama grubunda ise, solungaçlarda vakuol oluşumu (Şekil 4.16-A), nekroz (Teleangioectasiae) (Şekil 4.16-B), sekonder lamellerin uç kısmında çomaklaşma (Şekil 4.16-C), sekonder lamellerde birleşme ve kısalıp kalınlaşma (Şekil 4.16-D ve 4.17), kıkırdak doku hasarı (Şekil 4.17) ve hatta sekonder lamellerde düzleşerek kaybolma (Şekil 4.18) tespit edilmiştir.

Arsenik+propolis uygulanmış sazanların solungaç dokularında da sekonder lamellerin kısalıp kalınlaştığı ve yer yer düzleşmelerin meydana geldiği görülmesine rağmen,

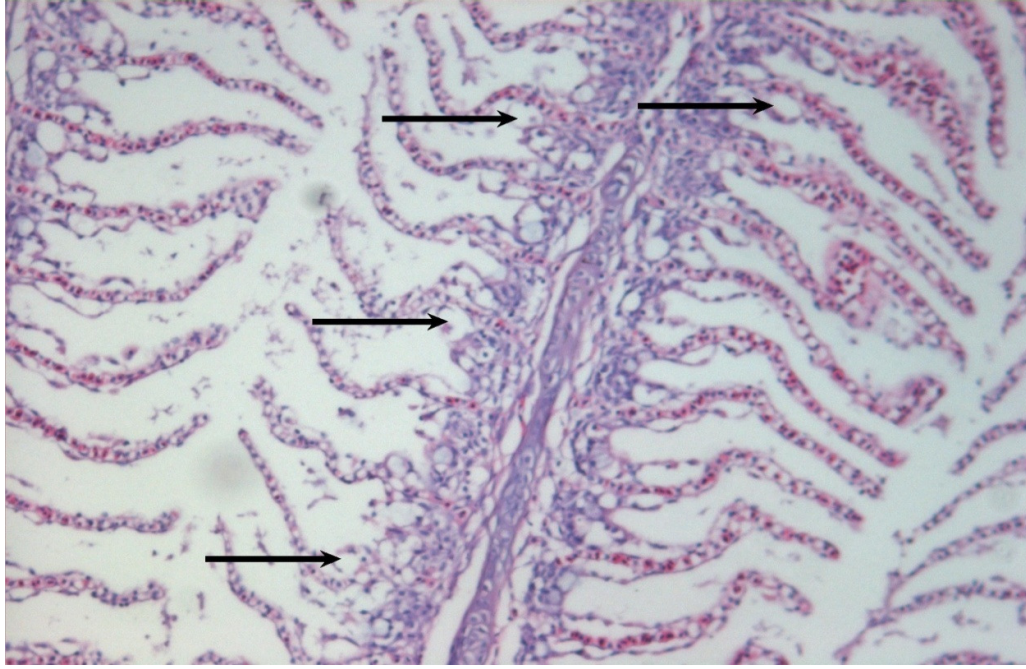
arseniğe maruz bırakılmış grubun solungaçlarında oluşan hasara göre bu durumun daha hafif olduğu saptanmıştır (Şekil 4.19).



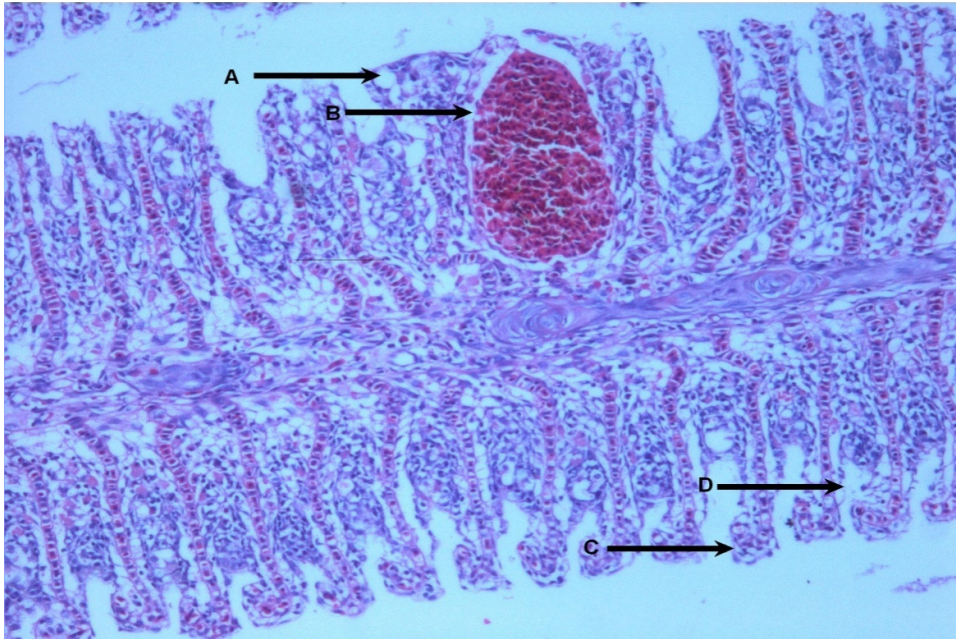
Şekil 4.13 Kontrol grubu solungaç dokusunun normal histolojik görünümü (HEx40)



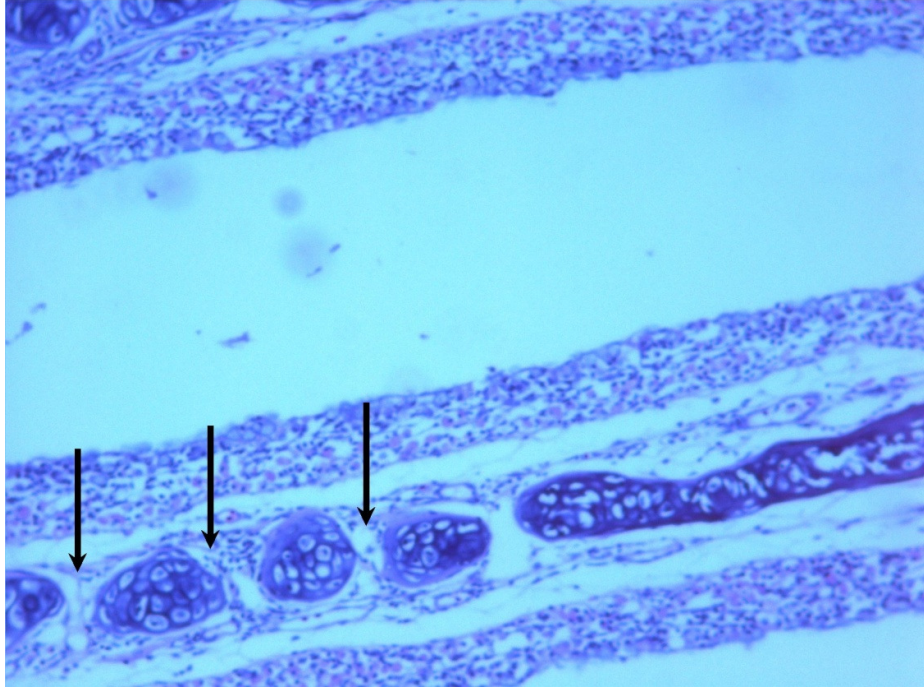
Şekil 4.14 Propolis grubu solungaç dokusunda meydana gelen vakuol oluşumları (oklar) (HEx40)



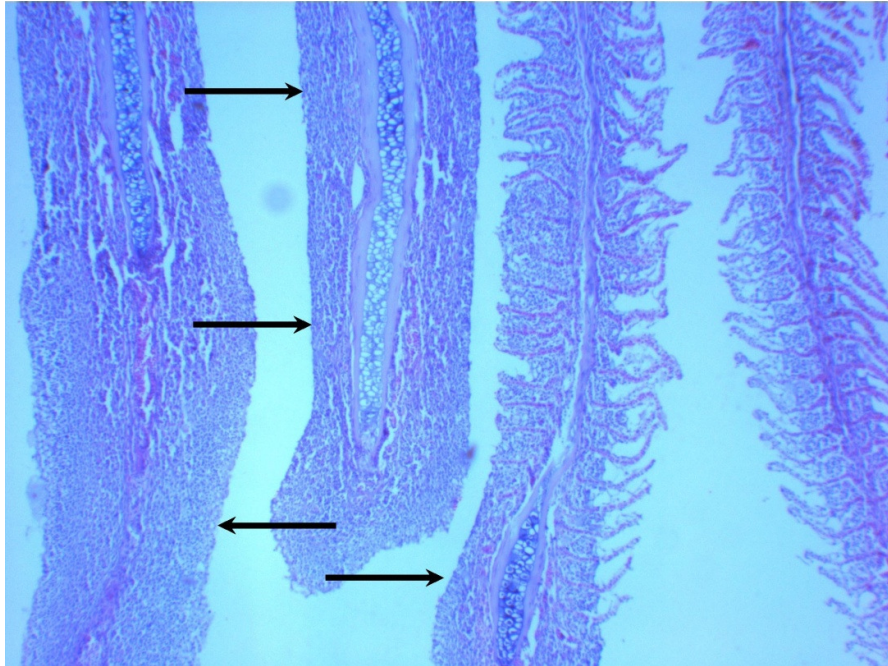
Şekil 4.15 Propolis grubu solungaç dokusunda meydana gelen vakuol (oklar) oluşumları (HEx100)



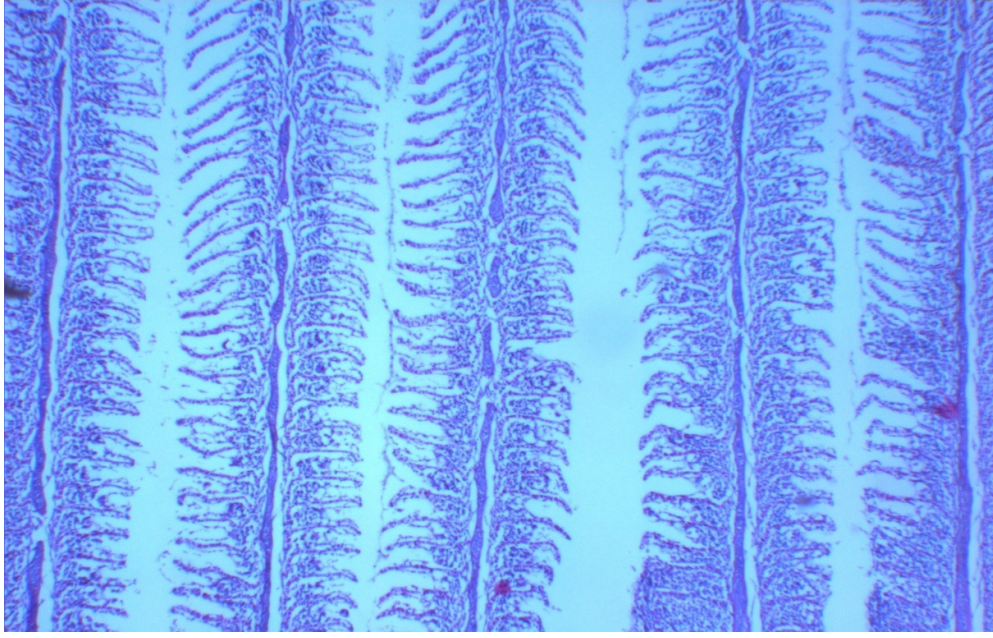
Şekil 4.16 Arsenik grubu solungaç doku kesitlerinde histopatolojik görünüm A- Vakuol oluşumu, B- Nekroz (Teleangioectasiae), C- Sekonder lamellerinin ucunun çomaklaşması, D- Sekonder lamellerin düzleşmesi (HEx100)



Şekil 4.17 Arsenik grubu solungaç dokusunda meydana gelen kıkırdak doku hasarı (oklar) ve sekonder lamellerin düzleşmesi, (HEx100)



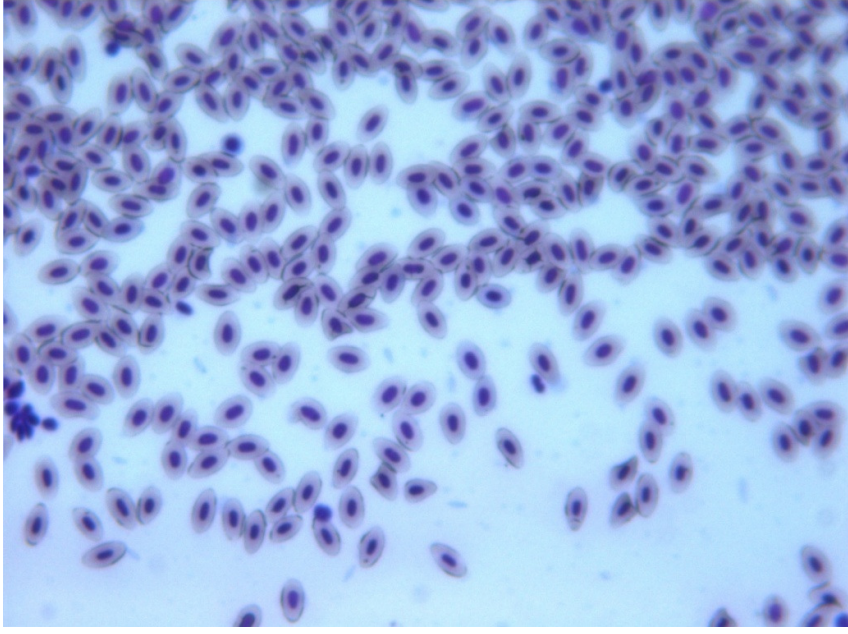
Şekil 4.18 Arsenik grubu dokusunda meydana gelen sekonder lamellerin düzleşmesi (oklar) (HEx40)



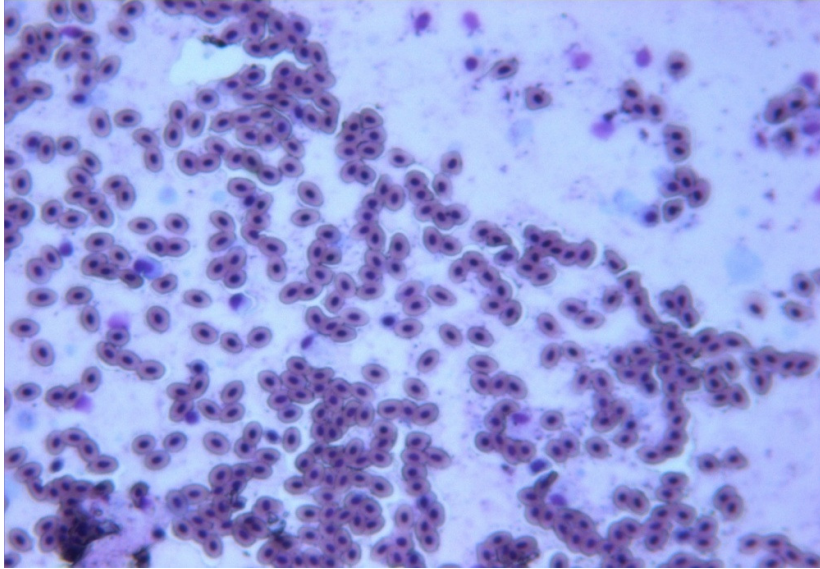
Şekil 4.19 Arsenik+propolis uygulama grubu solungaç doku kesitlerinde histolojik görünüm (HEx40)

4.3.4 Eritrosit Morfolojisi Sonuçları

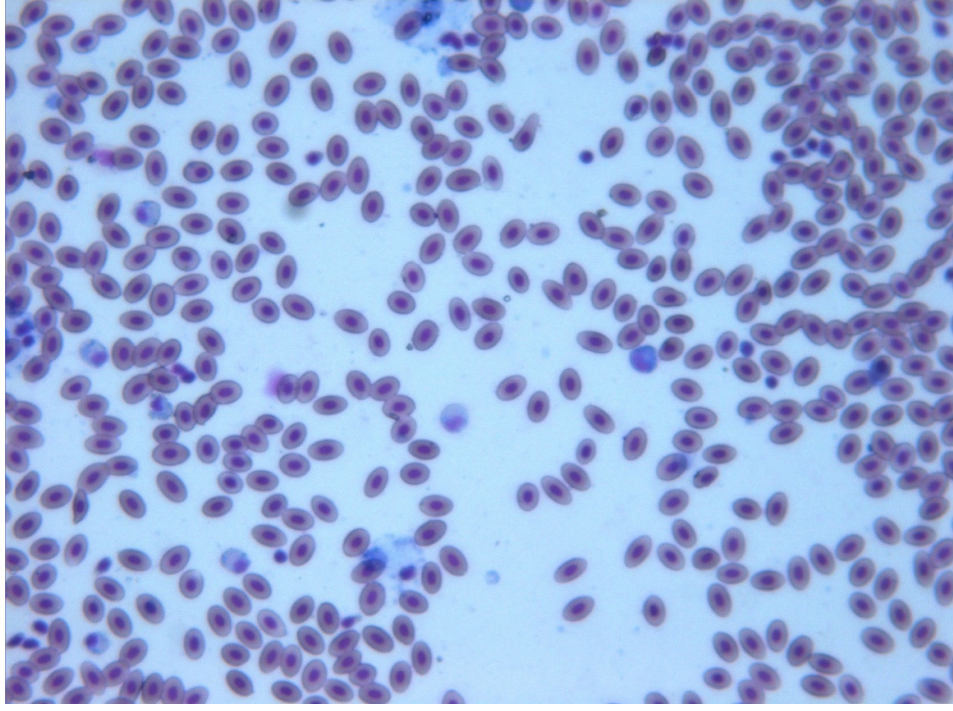
Pullu sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) kontrol grubu ve 7 gün süreyle 0.01 ppm arsenik, 10 ppm propolis ile 0,01 ppm arsenik ve 10 ppm propolis uygulaması sonrası kan dokuda gruplar arasında eritrosit morfolojileri bakımından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.20, 4.23)



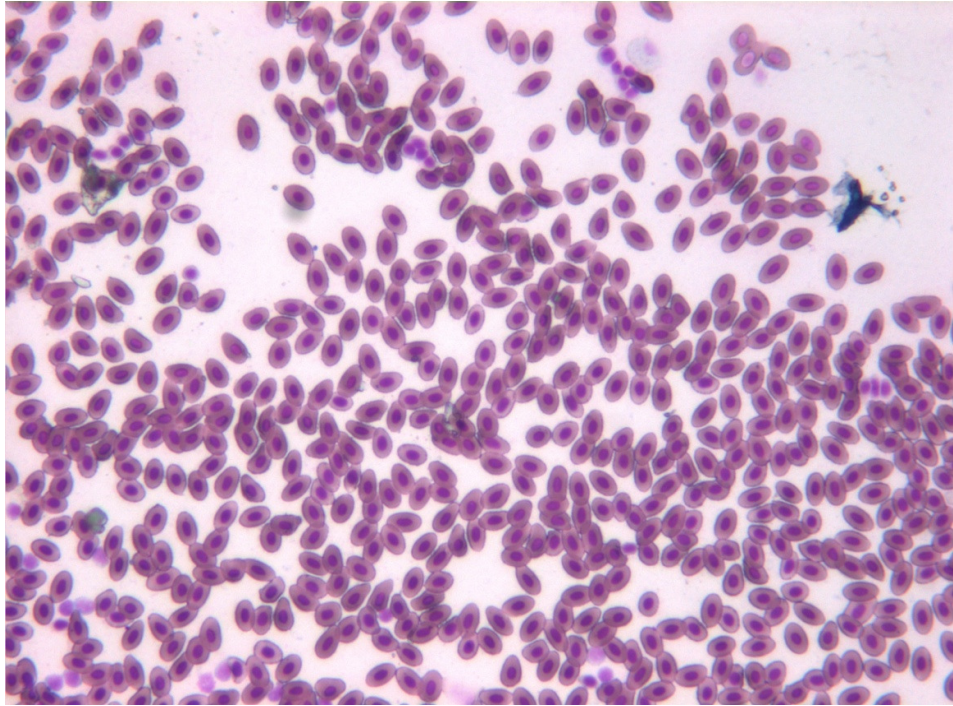
Şekil 4.20 Kontrol grubu eritrosit morfolojilerinin görünümü (HEx200)



Şekil 4.21 Propolis grubu eritrosit morfolojilerinin görünümü (HEx200)



Şekil 4.22 Arsenik grubu eritrosit morfolojilerinin görünümü (HEx200)



Şekil 4.23 Arsenik+propolis eritrosit morfolojilerinin görünümü (HEx200)

4.4 Çalışma Gruplarının Kas Dokusunda Ölçülen Biyokimyasal ve Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.4.1 Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.4.1.1 Laktik asit düzeyleri

Grupların kas dokularında ölçülen laktik asit miktarları incelendiğinde, kontrol grubuna göre propolis, arsenik+propolis ve arsenik gruplarında anlamlı artışlar olduğu gözlemlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.7). Arsenik+propolis ve propolis gruplarında laktik asit düzeyleri arsenik grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır ($P<0.05$) (Çizelge 4.7). Propolis grubu laktik asit düzeylerinde arsenik+propolis grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelirken ($P<0.05$), propolis grubu laktik asit değerleri ile kontrol grubu değerleri arasında anlamlı fark gözlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen laktik asit miktarları

GRUPLAR	LAKTİK ASİT (%)
Kontrol	0.242±0.003 ^d
Propolis	0.474±0.006 ^c
Arsenik + Propolis	0.528±0.001 ^b
Arsenik	0.563±0.002 ^a

[a,b,c,d] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.4.1.2 pH

Propolis, arsenik+propolis ve arsenik grubu kas dokusu pH değerleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre anlamlı azalmaların meydana geldiği görülürken ($P<0.05$) (Çizelge 4.8), arsenik+propolis uygulama grubu pH değerinde ise arsenik grubuna göre anlamlı bir azalış gözlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.8). Propolis grubunda meydana

gelen değişim, arsenik+propolis ve arsenik gruplarına istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen pH değerleri

GRUPLAR	PH
Kontrol	7.21±0.02 ^a
Propolis	6.59±0.02 ^{cb}
Arsenik+Propolis	6.54±0.01 ^c
Arsenik	6.61±0.01 ^b

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.4.1.3 TVB-N miktarı

Grupların kas dokularındaki TVB-N düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubuna göre arsenik ve arsenik+propolis uygulama gruplarında anlamlı artışlar görülürken ($P<0.05$) (Çizelge 4.9), propolis grubunun kontrol grubuna yakın değerde anlamlı değişimler gösterdiği gözlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.9). Propolis ve arsenik+propolis gruplarında TVB-N değerlerine bakıldığında, arsenik grubuna göre anlamlı azalışlar olduğu gözlemlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen TVB-N miktarları

GRUPLAR	TVB-N (nmol/100g)
Kontrol	0.046±0.001 ^c
Propolis	0.050±0.001 ^{cb}
Arsenik+Propolis	0.053±0.001 ^b
Arsenik	0.067±0.001 ^a

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.4.1.4 MDA düzeyleri

Grupların kas dokularında MDA düzeylerinin ölçüm sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arsenik grubunda anlamlı bir artış görülürken (P<0.05) (Çizelge 4.10), propolis ve arsenik+propolis gruplarında anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmektedir (P>0.05) (Çizelge 4.10). Arsenik+propolis ve propolis grupları MDA düzeyleri, arsenik grubuna göre anlamlı şekilde azalmıştır (P<0.05) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında ölçülen MDA düzeyleri

GRUPLAR	MDA Düzeyi (nmol/100g)
Kontrol	3.04±0.02 ^b
Propolis	3.03±0.19 ^b
Arsenik+Propolis	3.26±0.26 ^b
Arsenik	4.31±0.35 ^a

[a,b] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.4.2 Mikrobiyolojik analizler

4.4.2.1 TMAB sayımı

Kas dokularında toplam mezofilik bakteri sayımı sonucunda; grupların TMAB değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, arsenik, arsenik+propolis ve propolis gruplarında anlamlı azalışların meydana geldiği gözlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.11). Propolis ve arsenik+propolis uygulama gruplarında ise arsenik grubuna göre anlamlı azalmalar gözlemlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.11). Propolis ve arsenik+propolis grubu karşılaştırıldığında; propolis grubunda arsenik+propolis grubuna göre anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında TMAB sayımı

GRUPLAR	TMAB (log CFU/g)
Kontrol	538.33±40.86 ^a
Propolis	332.95±13.68 ^c
Arsenik+Propolis	168.18±6.42 ^d
Arsenik	429.54±3.93 ^b

[a,b,c,d] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata ($n=8$) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.4.2.2 PB sayımı

Kas dokusunda psikrofilik bakteri sayımını yaptığımız çalışmanın sonuçları incelendiğinde, propolis, arsenik ve arsenik+propolis uygulama grupları değerlerinin kontrol grubu değerlerine göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 13). Propolis ve arsenik+propolis grubunda ise arsenik grubuna göre anlamlı azalmalar gözlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 13). Propolis ve arsenik+propolis grubu karşılaştırıldığında ise anlamlı bir değişikliğin olmadığı dikkat çekmektedir ($P>0.05$) (Çizelge 13).

Çizelge 4.12 Deneyde kullanılan pullu sazanların kas dokularında PB sayımı

GRUPLAR	PB (log CFU/g)
Kontrol	227.63±2.49 ^a
Propolis	20.66±2.75 ^c
Arsenik+Propolis	13.41±1.07 ^c
Arsenik	118.59±3.08 ^b

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.5 Kan Dokusunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.5.1 Metabolitler

Çalışılan biyokimyasal parametrelerde; arsenik+propolis, arsenik ve propolis gruplarının albumin, kreatinin ve total protein seviyeleri kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı değişikliklerin olmadığı saptanmıştır (P>0.05) (Çizelge 4.13). Arsenik+propolis uygulama grubu, arseniğe maruz bırakılmış grup ile karşılaştırıldığında globulin düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir artışın meydana geldiği gözlemlenmektedir (P<0.05) (Çizelge 4.13).

Glukoz seviyeleri ele alındığında; propolis grubu glukoz değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken (P<0.05) (Çizelge 4.13), arsenik ve arsenik+propolis grupları değerleri ise kontrol grubu değerlerine göre istatistiksel olarak önemli bir azalma göstermektedir (P<0.05) (Çizelge 4.13). Propolis grubu glukoz seviyesindeki artış, arsenik+propolis ve arsenik grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (P<0.05) (Çizelge 4.13). Arsenik+propolis grubu glukoz miktarında, arsenik grubu değerlerine göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (P<0.05) (Çizelge 4.13).

Arsenik+propolis ve arsenik gruplarında trigliserit, üre ve VLDL değerlerinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak kayda değer bir artış meydana geldiği görülmüştür (P<0.05) (Çizelge 4.13). Arsenik+propolis grubu ile arsenik grubu

karşılaştırıldığında, arsenik+propolis grubundaki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.13). Propolis grubu, arsenik+propolis ve arsenik grupları ile karşılaştırıldığında, propolis grubundaki anlamlı azalmalar dikkat çekmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.13). Propolis grubu trigliserit, üre ve VLDL değerleri kontrol grubu düzeylerine yakın bulunmuştur ($P>0.05$) (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13 Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen metabolit düzeyleri

Biyokimyasal parametreler	Kontrol	Propolis	Arsenik+Propolis	Arsenik
Metabolitler				
Albumin (ALB) (IU l^{-1})	0.86 ± 0.13	0.88 ± 0.10	0.92 ± 0.12	0.91 ± 0.10
Globulin (GLOB) (IU l^{-1})	2.40 ± 0.21^a	2.35 ± 0.23^a	1.97 ± 0.15^b	1.06 ± 0.22^c
Total Protein (TP) (IU l^{-1})	3.38 ± 0.62	3.27 ± 0.54	2.94 ± 0.33	2.38 ± 0.21
Glukoz (IU l^{-1})	128.0 ± 1.25^b	137.2 ± 1.79^a	92.50 ± 1.70^c	75.00 ± 2.53^d
Kreatinin (CK) (IU l^{-1})	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.23 ± 0.02
Trigliserit (IU l^{-1})	$96,14 \pm 2.20^c$	99.17 ± 3.60^c	139.10 ± 4.10^b	179.14 ± 5.70^a
Üre (IU l^{-1})	4.20 ± 0.40^c	4.70 ± 0.51^c	7.25 ± 0.80^b	10.21 ± 1.20^a
Çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (VLDL) (IU l^{-1})	19.27 ± 1.81^c	24.13 ± 2.33^c	34.70 ± 3.20^b	65.70 ± 3.86^a

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata ($n=8$) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.5.2 Elektrolitler

Çalışılan grupların kan parametrelerinde elektrolit düzeylerine bakıldığında, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında kontrol ve propolis grubu Ca, P ve Na seviyelerine göre anlamlı bir azalış görülürken ($P<0.05$) (Çizelge 4.14), arsenik+propolis grubunda

arsenik grubuna göre anlamlı bir artış meydana gelmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.14). Propolis ve kontrol grubu değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir ($P>0.05$) (Çizelge 4.14).

K seviyesine bakıldığında; propolis ve arsenik grubunda, kontrol grubuna göre anlamlı değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir ($P>0.05$) (Çizelge 4.14). Arsenik+propolis ve arsenik grupları karşılaştırıldığında ise arsenik+propolis grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen elektrolit değerleri

Biyokimyasal parametreler	Kontrol	Propolis	Arsenik+Propolis	Arsenik
Elektrolitler				
Ca (Kalsiyum) (mmol l ⁻¹)	14.79 ± 0.86 ^a	13.20 ± 0.90 ^a	10.44 ± 0.79 ^b	9.12 ± 0.25 ^c
P (Fosfor) (mmol l ⁻¹)	11.58 ± 0.84 ^a	11.70 ± 0.67 ^a	9.42 ± 0.35 ^b	6.83 ± 0.42 ^c
K(Potasyum) (mmol l ⁻¹)	1.86 ± 0.09 ^a	1.78 ± 0.10 ^a	2.30 ± 0.06 ^b	2.54 ± 0.03 ^a
Na (Sodyum) (mmol l ⁻¹)	141.7 ± 3.80 ^a	141.5 ± 3.67 ^a	128.70 ± 3.70 ^b	107.6 ± 7.60 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.5.3 Enzimler

Çalışılan biyokimyasal parametrelerin gruplar arasındaki değişimleri incelendiğinde, arsenik+propolis ve arsenik gruplarında ALP ve AML değerlerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görülmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.15). Arsenik+propolis grubu arsenik grubu ile karşılaştırıldığında ALP ve AML seviyelerinin arsenik grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı

bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.15). Arsenik+propolis ve arsenik grupları propolis grubu ile karşılaştırıldığında, propolis grubu ALP ve AML değerlerinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlenirken ($P<0.05$) (Çizelge 4.15), kontrol ve propolis grupları arasında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.15).

Grupların ALT, AST ve LDH seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında anlamlı bir artışın olduğu ($P<0.05$) (Çizelge 4.15), propolis grubu değerlerinin ise kontrol grubuna yakın olduğu görülmektedir ($P>0.05$) (Çizelge 4.15). Arsenik+propolis ve arsenik gruplarının ALT, AST ve LDH seviyeleri karşılaştırıldığında, arsenik uygulanan gruba göre arsenik+propolis grubu değerlerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.15). Propolis uygulama grubu ALT, AST ve LDH değerlerinde, arsenik ve arsenik+propolis uygulama gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.15 Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen enzimatik parametreler

Biyokimyasal parametreler	Kontrol	Propolis	Arsenik+Propolis	Arsenik
Enzimler				
Alkalen fosfataz (ALP)(IU l ⁻¹)	36.10 ± 1.17 ^a	35.80 ± 1.20 ^a	28.75 ± 1.42 ^b	21.10 ± 1.80 ^c
Alanin aminotransferaz (ALT) (IU l ⁻¹)	28.14 ± 2.03 ^c	27.79 ± 1.96 ^c	42.14 ± 0.80 ^b	76.10 ± 2.10 ^a
Aspartat aminotransferaz (AST) (IU l ⁻¹)	261.5 ± 3.76 ^c	265.7 ± 3.84 ^c	357.10 ± 4.10 ^b	562.10 ± 5.90 ^a
Laktat ehidrogenaz (LDH) (IU l ⁻¹)	375.2 ± 6.80 ^c	392.1 ± 7.84 ^c	476.8 ± 7.10 ^b	586.2 ± 5.60 ^a
Amilaz (AML) (IU l ⁻¹)	93.14 ± 1.87 ^a	89.70 ± 2.59 ^a	65.75 ± 4.17 ^b	27.18 ± 8.12 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.6 Kan Dokusunun Hematolojik Analiz Sonuçları

4.6.1 Hematolojik parametreler

Deney gruplarında yer alan hayvanların hematolojik parametreleri incelendiğinde; arsenik ve arsenik+propolis grupları WBC ve agranülosit seviyelerinde kontrol ve propolis grubu değerlerine göre anlamlı bir artışın olduğu görülmüştür (P<0.05) (Çizelge 4.16). Arsenik+propolis grubunda ise arsenik grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış bulunmuştur (P<0.05) (Çizelge 4.16). Propolis grubu WBC ve agranülosit değerlerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli olmayan bir değişim meydana gelmiştir (P>0.05) (Çizelge 4.16)

Arsenik ve arsenik+propolis gruplarında granülosit, RBC, HB ve HCT değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görülürken ($P<0.05$) (Çizelge 4.16), propolis grubunda kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmamıştır ($P>0.05$) (Çizelge 4.16). Arsenik+propolis ve arsenik grupları granülosit, RBC, HB ve HCT değerleri karşılaştırıldığında, arsenik+propolis grubunda bu parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.16). Propolis grubunda ise arsenik ve arsenik+propolis gruplarına göre bir artışın gözlenmesi istatistiksel olarak kayda değer bulunmuştur ($P<0.05$) (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen hematolojik parametreler

Hematolojik parametreler	Kontrol	Propolis	Arsenik+Propolis	Arsenik
Lökosit (WBC)	8.19 ± 0.48 ^c	8.42 ± 0.33 ^c	10.66 ± 0.41 ^b	13.47 ± 0.32 ^a
Granulosit	92.0 ± 0.11 ^a	89.00 ± 1.41 ^a	80.20 ± 2.60 ^b	59.50 ± 1.37 ^c
Agranulosit	18.0 ± 0.12 ^c	11.00 ± 1.43 ^c	19.80 ± 2.63 ^b	40.50 ± 1.35 ^a
Eritrosit (RBC)	1.68 ± 0.04 ^a	1.67 ± 0.03 ^a	1.26 ± 0.05 ^b	0.86 ± 0.05 ^c
Hemogloblin (HB)	9.10 ± 0.10 ^a	9.33 ± 0.18 ^a	8.25 ± 0.21 ^b	7.67 ± 0.87 ^c
Hematokrit (HCT)	36.02 ± 0.91 ^a	36.2 ± 0.84 ^a	32.60 ± 0.71 ^b	25.85 ± 0.60 ^c

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$). Tabloda verilen değerler ortalama ± standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

4.6.2 Eritrosit indeksleri

Arsenik ve arsenik+propolis gruplarındaki hayvanların kanlarında bulunan eritrosit indekslerinden MCV ve MCH değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında meydana gelen artışın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$) (Çizelge 4.17). Propolis ve arsenik+propolis gruplarında MCHC değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olmadığı ($P>0.05$) (Çizelge 4.17), fakat arsenik grubunda MCHC değerlerindeki artışın diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlenmektedir ($P<0.05$) (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17 Deneyde kullanılan sazanların kanlarında ölçülen eritrosit indeksleri

Eritrosit indeksleri	Kontrol	Propolis	Arsenik+Propolis	Arsenik
Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV) (μ^3)	214.40 \pm 2.67 ^c	216.76 \pm 2.89 ^c	258.73 \pm 3.11 ^b	304.11 \pm 3.70 ^a
Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) (μ g)	54.16 \pm 1.67 ^c	55.86 \pm 1.74 ^c	65.47 \pm 1.92 ^b	90.23 \pm 2.04 ^a
Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) (%)	25.26 \pm 0.92 ^b	25.77 \pm 0.81 ^b	25.30 \pm 0.71 ^b	29.67 \pm 0.62 ^a

[a,b,c] Farklı harflerle gösterilen rakamlar, istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05). Tabloda verilen değerler ortalama \pm standart hata (n=8) değeri olarak ifade edilmektedir.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Bu çalışmada bir hafta boyunca arsenik (0.01 ppm) ve propolis (10 ppm) uygulamasına maruz bırakılan pullu sazan (*Cyprinus carpio*)'ların karaciğer, solungaç ve kas dokularında katalaz aktivitesi ile malondialdehit düzeylerinde meydana gelen değişimler tespit edildi. Ayrıca alınan pullu sazan dokularında histolojik incelemeler de yapıldı. Çalışma kapsamında, balık kas örneklerinde et kalitesi üzerine arsenik ve propolisin etkilerini tayin etmek amacıyla biyokimyasal (MDA, TVB-N ve laktik asit miktarı ile pH değerleri) ve mikrobiyolojik analizler yapılarak elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Kan örneklerinde ise biyokimyasal ve hematolojik parametrelerin çalışılmasının yanı sıra, eritrosit morfolojilerindeki değişimler de incelendi.

Ekosistemde sucul ortamlar özellikle toksik kirleticilere karşı çok hassastırlar. Endüstride ve tarımda kullanılan bazı kimyasallar belirli miktarlarda denizlere ve diğer sucul ortamlara geçerek bu ortamları kirletip canlı ve cansız çevre için ciddi tehditler oluşturmaktadırlar. Son zamanlarda potansiyel olarak toksik etkiye sahip olan ağır metallerin denizlere ve tatlı sulara girmesi küresel bir problem haline gelmiştir [34,92]. Sucul çevrede en çok birikime uğrayan ağır metallerden biri de arseniktir. Arsenik; ppm'den ppb'ye değişen konsantrasyonlarda toprakta, suda ve canlı organizmalarda bulunmaktadır [12]. Şehir şebekesine verilen sularda sağlık açısından üst limit olarak belirlenen arsenik miktarının 50 ppb (mikrogram/litre)'den 10 ppb'ye düşürülmesinden sonra canlılarda arsenik birikiminin azaldığı görülmekte ve bu azalma ekolojik açıdan büyük önem arz etmektedir [93]. Biz de çalışmamızda bu bilgileri göz önünde bulundurarak pullu sazanlara, doğal ekolojik ortamda canlıların da maruz kalması en muhtemel doz olarak belirlediğimiz 0.01 ppm arseniği uygulamış bulunmaktayız.

Biyoundikatör olarak su kirliliğinin izlenmesinde ve besin zinciri yoluyla kirliliğin diğer canlı sistemler üzerine etkilerinin araştırılmasında önemli bir rol oynayan balıklar, bu tür çalışmalarda bilgi vermesi açısından sıkça kullanılmaktadırlar. Çünkü balıklar sucul ortamda meydana gelen değişimlere karşı aşırı hassas oldukları gibi, çok kısa sürede

fizyolojik ve biyokimyasal yanıt oluşturabilmektedirler. Sucul canlıların ağır metallere maruz kalması sonucu, canlının fizyolojik birimlerinde ağır metal birikimleri meydana gelmektedir. Bu birikimler canlılarda hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri ve hidroksil radikalleri gibi oksidatif stres oluşturan ROS'ların artışına ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin değişmesine sebep olabilen çeşitli hasarlara yol açabilmektedir [34,92].

Vücutta meydana gelen hasarlara cevap veren temel savunma unsurlarından biri olan CAT, bütün biyolojik membranların içine girebilen ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesine sebep olabilen H₂O₂'yi su ve oksijene indirgeyerek canlıları oksidatif sürecin hasarlarından koruyabilen bir antioksidan enzimdir [34]. Bu durumda, CAT aktivitesinde meydana gelen azalmalar H₂O₂ düzeylerinde artışlara sebep olabilmektedir [94]. Böylece H₂O₂ düzeylerinin artması sonucunda da, bu reaktif maddeler biyomoleküllere zarar vererek hücre ve dokularda hasarlara yol açmaktadır.

Palaniappan ve Vijayasundaram'ın yaptığı bir çalışmada; 30 gün boyunca 96 ve 144 µg/L arseniğe maruz kalmış juvenil *Labeo rohita* balıklarının kas ve karaciğer dokularında arseniğin asit fosfataz, alkalin fosfataz, glutamat piruvat transaminaz ve glutamat oksaloasetat transaminaz aktiviteleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, arseniğin enzim aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığına vurgu yapılmıştır [92].

Atlı ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada; tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'lara 96 saat, farklı konsantrasyonlarda Ag⁺², Cd⁺², Cr⁺⁶, Cu⁺² ve Zn⁺² uygulanmış, balıkların karaciğer, böbrek, beyin, solungaç ve bağırsak dokularının katalaz aktivitesi ölçülmüştür. Karaciğer dokusunda Ag⁺² haricinde diğer ağır metallerin bütün dokularda CAT aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. En yüksek CAT aktivitesinin 1.0 mg/L Cd⁺²'ye maruz bırakılan balıklarda olduğu görülmüştür. 0.5 mg/L Ag⁺²'ye maruz kalan canlılarda ise CAT aktivitesinde keskin bir azalış olduğu rapor edilmiştir [34]. Bu çalışmada solungaçlarda ise; Cd⁺² ve Cu⁺²'nin CAT aktivitesini etkilememesine rağmen 0,5 mg/L Ag⁺²'ye maruz kalan canlıların CAT aktivitesinde artış meydana geldiği ifade edilmiştir. Bunun yanı sıra 1,5 mg/L Cd⁺⁶'ya maruziyet sonucu CAT aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir [34].

Ağır metaller, antioksidan enzimlerin aktivitesini azaltıp serbest radikal üretimini arttırdığı için hücrel membranlarda lipit peroksidasyonun oluşumuna yol açarlar. Balıklarda ağır metallerin birikimi sonucu, özellikle yağ asitlerinin oksidasyonuna sebep olabilen, hidroksil radikallerinin oluşumu ve hidrojen peroksitlerin artışı ile GSH-Px ve CAT aktivitesinde azalmaların meydana geldiği yapılan araştırmada rapor edilmiştir [34].

Hücrelerde meydana gelen membran hasarları lipit peroksidasyonunun uyarılmasına ve antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalmasına neden olur. Bu şekilde hücre zarlarının yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hasarlı dokularda lipit peroksidasyonunun daha hızlı ilerlemesine ve dokulardaki peroksidasyona yatkınlığın artmasına yol açan bu durumlar, antioksidan enzim aktivitelerinin inaktivasyonunun ve metal iyonlarının (demir ve bakır) hücre içinde serbest hale gelmesinin bir sonucudur [95]. Lipit peroksidasyonun başlamasında ve ilerlemesinde rol oynayan en önemli faktörlerden biri de ROT'ların artışıdır. ROT'un hücre bileşenlerine oksidatif saldırısı sonucu canlı sistemlerde birçok hasar oluştuğu belirtilmiştir [96]. Oksidatif stresin biyolojik indikatörlerinin artışı ve modifikasyonların meydana gelmesi, bazı patolojik durumların tespitinde belirleyici bir rol oynamaktadır [97]. Bu indikatörlerden biri de lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'dır. MDA'nın konsantrasyonu serbest radikallerin sebep olduğu toksik süreçle direk ilişkilidir [98].

Yapmış olduğumuz çalışmada, arseniğin karaciğer, solungaç ve kas dokularında oluşturduğu toksik etkiden dolayı dokularda CAT aktivitesini düşürdüğu ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA'yı arttırdığı yönünde ortaya çıkan bulgularımız yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir [34,92,98-100].

Kas ve karaciğer dokularının CAT aktivitesinde meydana gelen azalışların sebebinin, serbest radikallerin protein sentezini baskılamasından dolayı olduğu düşünülebilir [92,100]. Ayrıca, dokulara giren H₂O₂ ve türevlerinin aşırı derecede artmasından dolayı da CAT aktivitesinin düştüğu savunulabilir [34].

Toksik maddelerin hücrede oluşturduğu oksidatif hasarlara karşı vücudu savunan ve koruyan sistemler bazen yetersiz kalabilmektedir. Böyle durumlarda bu antioksidan

sistemlerin toksik ve karsinogenik ajanlara karşı hassasiyetleri artmaktadır. Bu gibi durumlarda ROT ile indüklenmiş hücresel hasarlara karşı canlıları ve endojen antioksidan sistemleri koruyan ve onların yükünü hafifleten uygun eksojen bütünleyicilere gereksinim duyulmaktadır [101]. Eksojen antioksidanlar arasında özellikle son zamanlarda doğal kaynaklı olan ürünler, birçok araştırmacı ve araştırma grupları tarafından büyük ilgi görmüştür. Günümüzde, sahip olduğu birçok biyolojik aktivite ile dikkat çeken bu doğal antioksidanlardan biri de çalışmalarımızda da kullandığımız bir arı ürünü olan propolistir.

Kanbur ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada propetamplar'a maruz kalan Wistar albino sıçanlarda propolisin antioksidan etkisi araştırılmış ve 28 gün maruziyet sonunda, karaciğer dokularında MDA düzeyleri, SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri ölçülmüştür. Grupların CAT aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, propetamp grubunda CAT aktivitesinde anlamlı azalışlar gözlemlenirken, propolis grubunun kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu bildirilmiştir. MDA düzeyleri ise; kontrol grubu ile propetamp uygulamasına maruz kalan canlılar karşılaştırıldığında, propetamp grubunda anlamlı artışlar meydana gelirken, propolis grubunda kontrole göre anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir. Propetamp ve propolisin her ikisinin de uygulandığı grupta ise enzimatik parametrelerin kontrol grubuna yakın olduğu ifade edilmiştir [48].

Sun ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, propolisin sıçanlarda C ve E vitamini ile etkileşimi ve antioksidatif aktivitesi *in vivo* olarak incelenmiş ve sıçanlarda E vitamini yetersizliği ile oksidatif stres oluşturularak propolisin iyileştirici etkisi değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, deney sonucunda propolisin bazı bileşenlerinin kan dolaşımına geçerek bir antioksidan gibi davrandığını ortaya çıkarmışlardır. Aynı çalışmada, 8 hafta sonunda propolis uygulanan gruptaki hayvanların kalın bağırsaklarında lipid hidroperoksidasyon konsantrasyonunun önemli oranda azaldığı rapor edilmiştir [4].

Bir çalışmada, ısı aracılığı ile yanık oluşturulan sıçanların plazmasındaki lipid peroksidasyon ve nitrik oksit düzeyleri üzerine propolisin temel aktif bileşiklerinden olan kafeik asit fenil etil ester (CAPE)'in etkisi araştırılmıştır. Çalışmada, CAPE eklenen grupta SOD aktivitesinde azalmalar önlenerek [42] ve ksantin oksidaz

aktivitesi inhibe edilerek ROS üretiminin tam olarak bloke edilmesi sonucu CAPE'nin antioksidan etki gösterdiği bildirilmektedir [42,46]. Bunun yanı sıra, MDA ve nitrik oksit düzeylerini de düşürdüğü aynı çalışmada rapor edilmiştir [42].

Yapmış olduğumuz çalışmada, arsenik, propolis ve arsenik+propolis uyguladığımız canlıların karaciğer, solungaç ve kas dokularının MDA ve CAT değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, propolis grubu MDA düzeyi ve CAT aktivitesinin kontrol grubuna yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. Arsenik ve arsenik+propolis uygulanan balıkların dokularında CAT aktivitesi, kontrol grubu değerlerine göre anlamlı bir azalma gösterirken, MDA düzeyleri ise artış göstermektedir. Arsenik+propolis ve arsenik gruplarında bulunan hayvanların dokularından elde edilen değerler arasındaki değişime bakıldığında; arsenik uygulama grubuna göre arsenik+propolis grubunda CAT aktivitesinde artış meydana gelirken, MDA seviyesinde azalma tespit edilmiştir.

Arsenik uygulamasının yanı sıra bir antioksidan olan propolisin birlikte uygulandığı deney grubunda yer alan hayvanların dokularının, arseniğin zararlı etkilerine karşı korunmasında, özellikle propolisin içeriğinde bulunan flavonoidlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Bu etkiyi flavonoidlerin iyi bir H⁺ ve e⁻ vericisi olması sebebiyle gerçekleştirebildiği ve bu özelliğiyle propolisin, hücrel membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitlerini oksidanlara ve lipid peroksidasyonuna karşı koruyarak, bir antioksidan gibi rol oynayıp arseniğin zararlı etkilerini elimine ettiği fikrini akla getirmektedir [42,102].

Çalışmalarımız sonucu elde ettiğimiz bulgular, hem arseniğin zarar verici etkilerini vurgulayan çalışmalarla [4,43,48] hem de propolisin antioksidan etkilerinin var olduğunu gösteren araştırmalarla desteklenmektedir [45,48,50].

Sucul ortamlarda meydana gelen ağır metal kirliliğinin balıklar üzerindeki en önemli göstergelerinden biri de balıkların kan parametrelerindeki değişimlerdir. Balık kanlarındaki üre ve kreatinin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler, balıklarda karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların göstergeleridir [103,104]. Kolesterol ve trigliserit canlılardaki besinsel durumun, yağ ve karbonhidrat metabolizmalarının işleyişinin ve metabolizmadaki değişimlerin gösterilebilmesinde

sıkça kullanılan parametrelerdir. Kandaki kolesterol değerinde meydana gelen değişiklikler, karaciğerde hasarların olduğunun ve nefritik sendromların meydana geldiğinin bir göstergesi olarak analiz edilebilmektedir. Trigliserit ise lipit metabolizmasının bir göstergesidir ve yüksek konsantrasyonları nefritik sendromları ya da glikojenin depolanmasında meydana gelen bozuklukların belirleyicilerinden biri olabilir. Glukoz düzeylerinin ise yetersiz beslenme durumlarına ya da karaciğer fonksiyon bozukluklarına işaret edebildiği düşünölmektedir [103]. AST ve ALT glukojenik enzimlerdir ve başlıca sentez yerleri karaciğerdir. Serumda normal koşullarda bulunmazlar. Enzim sentezinin durması ve ortam koşullarına adaptasyon sağlanması için enerji gereksiniminin karbonhidrat haricindeki kaynaklardan sağlanmasının durdurulması ile de ALT ve AST değerlerinde değişiklikler meydana geldiği söylenebilir. Toksik maddelerin ve serbest radikallerin yol açtığı hasarların membran bütönlüğünün etkilenmesine neden olmasının yanı sıra, AST, ALT ve LDH enzimlerinin doğrudan kana salınmasına yol açarak bu enzimlerin düzeyinin kanda artışına sebep olması söz konusudur. Ayrıca, AST düzeylerindeki değişimler toksik etkili kimyasalların yanı sıra dokularda oksijenin azalması (hipoksi) ve açlık gibi stres faktörlerinin etkisiyle de meydana gelmektedir. Bütöün bunların ötesinde, serum AST ve ALT düzeyleri, doku dejenerasyonu ile meydana gelen protein metabolizmasındaki değişimleri yansıtmaması bakımından da önem taşımaktadır. Bununla beraber bütöün bu parametrelerdeki değişimin, karaciğer ve böbreğin nekrozisini içeren bir patolojik durumla ilişkili olduğu söylenebilir [104,105]. İnflamasyon, nekrozis ve major hepatoselöler hastalıklar plazmadaki ALT ve AST'deki artışların nedeni olabilir. ALP seviyesindeki azalışlar ise hipofosfatazemi, hipotiroidizm, ağır anemi ve kreatinizm gibi hastalıkların bir sonucu olabilir [106]. AST'ler, karaciğer ve kas fonksiyonu bozuklukları gibi durumlarda hasarlanmış karaciğer hücrelerinden kaçarak plazmaya geçerler ve plazmada AST seviyesini artırırlar. Plazma ALT seviyesi ise, karaciğerdeki hasarın göstergesi olarak yaygın şekilde analiz edilen bir enzimdir. Bu enzimin karaciğerde yüksek miktarda bulunması, hücresel dejenerasyonlardaki artışın bir göstergesidir. AST, ALT ve ALP konsantrasyonlarındaki değişiklikler canlıların, ağır metaller gibi çevresel akümüülasyona uğrayabilen toksik maddelere maruz kalmasından dolayı da meydana gelebilir [99].

Jen-Lee Yang ve Hon-Cheng Chen'in yaptıkları bir çalışmaya göre; belirli dozlarda (2 mg/L, 4 mg/L, 8 mg/L) galyum'a maruz kalan sazanların 28 gün sonra serum biyokimyasal parametreleri incelendiğinde, total protein seviyelerinde kontrole göre, galyum uygulanan gruplarda anlamlı bir değişimin olmadığı tespit etmişlerdir. Kreatinin, trigliserit, üre, VLDL ve glukoz seviyelerinde 4 mg/L ve 8 mg/L'lik uygulamalarda istatistiksel olarak önemli artışların olduğu belirtilirken, 2 mg/L'lik uygulamalarda herhangi anlamlı bir değişikliğin olmadığı rapor edilmiştir. Uygulama gruplarının kolesterol seviyelerinde ise kontrole göre anlamlı azalışlar olduğu bildirilmiştir [103].

Örün ve Talas'ın gökkuşağı alabalıkları üzerine yaptıkları bir çalışmada; 2 mg/L Cd⁺² ve 2 mg/ L Cr⁺² uygulamaları sonrasında, biyokimyasal ve hematolojik parametreler incelenmiş ve Cd⁺² uygulanan canlılarda üre, total protein, albumin, ALP, ALT, AST parametrelerinde kontrole göre anlamlı artışlar olduğu gösterilmiştir. Cr⁺² uygulanan grupların üre, total protein, albumin, ALT, AST ve ALP seviyelerinde kontrole göre anlamlı artışlar meydana geldiği rapor edilmiştir [107].

Al-Sayeda ve arkadaşları, yaptığı bir çalışmada erkek sıçanlarda alüminyumla indüklenmiş lipit peroksidasyonu ve kan biyokimyasal parametreleri üzerine propolisin etkilerini incelemişlerdir. Erkek sıçanlara oral yoldan 70 gün boyunca 34 mg/kg bw alüminyum uygulanmış ve plazmada AST, LDH, glukoz, üre, kreatinin, total lipit, kolesterol, trigliserit ve LDL seviyelerinde artış meydana gelirken, total protein, albumin ve HDL seviyelerinde AlCl₃ uygulaması sonucu azalmaların olduğunu tespit etmişlerdir [99].

Yaptığımız çalışma sonucunda, arsenik toksisitesine maruz kalan canlı grubunun serum metabolit ve enzim değerleri incelendiğinde; albumin, total protein ve kreatinin seviyelerinde kontrol ve propolis gruplarına göre anlamlı değişiklikler olmadığı tespit edilmiştir. Diğer parametrelere bakıldığında ise, arsenik grubu ALP, amilaz, globulin, glukoz değerlerinde kontrol ve propolis gruplarına göre anlamlı azalışlar olduğu, ALT, AST, LDH, trigliserit, üre ve VLDL değerlerinde ise anlamlı artışlar olduğu gözlenmiştir.

Kontrol ve propolis gruplarına göre arsenik grubunda; ALP, amilaz, glukoz ve globulin seviyelerinde meydana gelen değişikliklerin nedeni olarak, arseniğın toksik etkiye sahip olması ve bu parametreler üzerine azaltıcı etki yapmasıyla metabolizmaya, özellikle pankreas, karaciğer ve böbrek dokularına hasar vermesi ile kan değerlerinde azalmaların meydana geldiği düşünülebilir. Albumin, total protein ve kreatinin seviyelerinde anlamlı değişikliklerin meydana gelmemesinin nedeni olarak da, uygulanan arsenik dozu ve uygulama süreleri bir faktör olarak düşünülebilir. 0.01 ppm arsenik uygulamasına ilave olarak 10 ppm propolis uygulaması yapıldığında biyokimyasal değerlerin kontrol ve propolis değerine yaklaştığı gözlenmiştir. Bu analiz sonuçlarına dayanarak, propolisin arseniğın hasar verici etkilerini azaltabildiğini düşünmek mümkündür [46].

Artrit oluşturulmuş sıçanlar üzerine yapılan bir çalışmada, artritli sıçanlara uygulanan propolisin, ALT ve AST enzimlerinin seviyelerini kısmen düşürdüğü gözlemlenmiş fakat bu etkinin mekanizmasının henüz belirlenemediği vurgulanmıştır [54].

Sadece propolis uygulanan grupta albumin, globulin, trigliserit, üre, VLDL, ALP, ALT, AST ve LDH değerlerinde kontrole göre anlamlı değişiklikler meydana gelmemiştir. Trigliserit, VLDL ve LDH değerlerinde kontrole göre anlamlı farklılıkların olmamasının nedeni olarak, propolisin sahip olduğu kan basıncını ve lipit seviyesini düzenleyebilme özelliği düşünülebilir [108]. ALP, AST ve ALT değerlerinde değişikliklerin olmaması karaciğerde herhangi bir hasarın meydana gelmediğini ve buna bağlı olarak üre değerinde de anlamlı değişikliğin gözlenmemesi böbrek fonksiyonlarında herhangi bir anormalitenin oluşmadığının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Kontrol grubuna göre propolis grubunda gözlenen glukoz seviyesindeki artışlar, propolisin içeriğinde bulunan karbonhidratlı bileşenlerin metabolizmaya katılmasının bir sonucu olarak düşünebilir.

Sodyum, klor ve potasyum, diğer minerallerle birlikte vücutta elektrik akımını ilettikleri için elektrolit adını almaktadırlar. Elektrolitlerin vücuttaki fonksiyonları hücre içinde ve dışında sıvı ve asit-baz dengesinin kontrolünü sağlamaktır. Sodyum ve klor hücre dışında, potasyum ise hücre içinde çalışmaktadır. Elektrolitler, sinir ve kas çalışmasında; elektrokimyasal uyarıları sinir hücresi boyunca taşıyarak uyarıların kasa iletilmesini sağlarlar [109]. Çalışmamızdan elde edilen elektrolit verilerine bakıldığında,

arsenik uygulanan canlıların kan sodyum, fosfor ve kalsiyum değerlerinde kontrol ve propolis uygulama grubuna göre anlamlı azalışlar olduğu görülmekte, potasyum değerlerinde ise anlamlı değişikliğin olmadığı görülmektedir.

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; kas dokusu ve sinir hücrelerinde meydana gelen hasarlar hakkında fikir edinmek amacı ile karşılaştırılan potasyum ve sodyum değerlerinin, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında kontrol ve propolis grubu değerlerine göre farklı yönde değiştiği görülmektedir. Bu karşılaştırmada meydana gelen farklılığın, arsenik uygulamasının ortamda oksidatif stres oluşturarak elektrokimyasal iletiler için önemli olan sodyum-potasyum iyon dengesini etkilediği, dolayısı ile kas dokusu ve sinir hücrelerinde anormalliklerin meydana geldiği düşünülebilir. Bunun yanında arsenik maruziyetinden dolayı; D vitamini emiliminin azalması sonucu, yapılan analizlerde kalsiyum ve fosfor miktarında düşüşlerin meydana geldiği görülmektedir. Arsenik uygulaması ile etkilenen sindirim sisteminde su kaybının artmasıyla birlikte kan basıncında ve kan hacminde önemli düşüşler gözlemlenmektedir [110]. Bu veriler doğrultusunda, arsenik (0.01 ppm) uygulamasına ek olarak 10 ppm propolis ilavesi sonucu, arseniğin oluşturduğu zararlı etkilerin sodyum, potasyum ve kalsiyum değerleri için hasarları indirgeyici etki yaptığı söylenebilir.

Propolisin içerdiği antioksidan özellikteki flavonoidler, doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girip temizleyici görev yaparak karaciğeri, kolesterolün artışıyla meydana gelebilecek harabiyetten koruyabilir. Sonuç olarak, karaciğerin işlevinin normal bir şekilde devam etmesiyle, hem kolesterol hem de karaciğer enzimlerinin değerlerinin normal düzeylerde kalmasını sağlayabileceği düşünülebilir. Aynı zamanda propolis yine antioksidan özelliğini göstererek radikalleri hücrelerden uzak tutar ve hücre zarları bütünlüğünü koruyarak iyon geçişlerinde meydana gelecek hasarları önleyerek elektrolit değerlerinin normal seviyede tutulmasını mümkün kılabilir [46]. Çalışmamızın sonuçları da, propolisin kuvvetli bir antioksidan potansiyele sahip doğal bir ürün olduğunun ortaya konulmasında önemli veriler içerdiği söylenebilir.

Örün ve Talas'ın yaptığı benzer bir çalışmaya göre, kadmiyum ve krom uygulanan alabalıkların kanlarında kalsiyum, sodyum ve klor değerlerinde azalmalar gözlenmiştir. Bu veriler çalışmamızın sonuçlarını da destekler niteliktedir [107].

Adriana Borges ve arkadaşlarının, farklı dozlarda subletal sipermetrin uygulaması sonucu, *Rhamdia quelen* türünün serum biyokimyasal ve hematolojik parametrelerinde meydana gelen değişiklikleri incelemek üzere yaptıkları bir çalışmada, sipermetrin uygulaması ile sodyum ve fosfor değerlerinde artışların olduğu tespit edilmiştir [111].

Diğer araştırmacılar tarafından yapılan bazı çalışmaların verileri de, sonuçlarımızla paralellik göstermektedir [99,104,107,108].

Hematolojik parametreler, balıkların fizyolojik durumlarının bir göstergesi olması nedeniyle, stres ve hastalıkların tespitinde kullanılan önemli belirteçlerdir. Bu parametreler, toksikolojik çalışmalarda da sıklıkla incelenmektedir. Balıklar kan hücrelerinin miktarlarını, farklı fizyolojik mekanizmalara karşı, savunma amaçlı kullandıkları için standart sabitlere uygun sayıda tutmak için uğraşlar. Organizmalar, kan indekslerini (RBC, HB ve HCT) kirleticilere ve metabolizmaya hasar veren maddelere karşı sekonder cevap olarak kullanabilmektedirler. Düşük konsantrasyonlu ağır metallerle maruz kalmanın sonucunda, çoğunlukla savunma hücrelerinin sayısında kısa süreli artışlar gözlemlenebilir. Balıklarda stres reaksiyonlarının başlamasına neden olan faktörler genellikle kimyasal maddelerdir. Balıkta stres reaksiyonları, osmotik dengesizlik ve iyonik değişimi düzenleyici sistemlerde değişiklikler (örneğin; kan pH'sının düşmesi, eritrosit hacmindeki artış ve buna bağlı olarak hematokrit yüzdesinde artışlar) şeklinde olmaktadır. Stres altında kalan canlıların dalak ve karaciğerlerinde kasılmaların olması ile eritrositler organlardan kana karışmakta ve bu durum kanda yüksek HCT düzeylerinin oluşumuna yol açmaktadır.

Arsenik grubunda hematolojik parametrelere bakıldığında, toksik etki nedeniyle, lökosit ve agranülosit değerlerinin kontrol ve propolis grubuna göre arttığı görülmektedir. Arsenik uygulaması sonucu lökosit değerlerindeki artışın nedeni, metabolizmada hasarlayıcı toksik reaksiyonlara karşı vücudun savunmaya geçerek direnç göstermeye çalışmasıdır. Agranülosit değerinin artması ise, herhangi bir organda çok hızlı ilerleyen bir enfeksiyonun göstergesi olarak düşünülebilir. Granülosit, eritrosit, hemoglobin ve hematokrit değerlerinde meydana gelen azalmaların ve MCV, MCH ve MCHC değerlerindeki artışın nedeni olarak toksik etki ile meydana gelen stres sonucu karaciğerin zarar görmesi ve bu nedenle kan hücrelerinin üretilmemesinden dolayı

anemi durumlarının oluřtuđu dűřünülebilir. Arsenik doz grubuna ek olarak 10 ppm propolis uygulanması sonucu hematolojik incelemelerin kontrol ve propolis grubu deęerlerine yaklařtıęı gűrűlműřtűr. Bu verilere dayanarak çeřitli besinsel bileřenlerinin yanı sıra propolis içerięinin demirce zengin yapısıyla da terapűtik etki gűstererek anemi durumunu giderdięi, ayrıca içerięindeki antioksidanlarla pH dűzeylerini ve ozmotik dengeyi dűzenledięi için hematolojik deęerlerin kontrol ve propolis grubuna yaklařtıęı dűřünülebilir.

Literatűrde bulunan bazı çalıřmaların sonuçları da bizim bulgularımızı destekler nitelik gűstermektedir [109,112-114].

Balıklar, ekolojik kirlilięin derecesini gűsterebilen canlılar olmalarının yanında insan diyetinde de űnemli bir yer tutmaktadırlar. Bu nedenle balık etinin tűketim sırasındaki kalite ve tazelięi de bűyűk űnem tařımaktadır. Bu nedenle çalıřmamız sırasında hem balık etinin tazelięinin bir gűstergesi olarak hem de kas dokusunun yapısal kompozisyonlarının indikatűrleri olarak sıkça kullanılan laktik asit, pH, TVB-N, MDA gibi biyokimyasal parametreler arařtırılmıř ve mikrobiyolojik analizler (TMAB, PB) yapılmıřtır.

Balık etinin arsenik ve arsenik+propolis grubunda laktik asit seviyelerinin, kontrol grubuna gűre yűksek olduęu gűrűlmektedir. Stres durumunda, uzun sűreli ve hızlı kas aktivitesi gűsterildięinde, ortamdaki oksijen miktarı yetersiz kalacaęından ihtiyaç duyulan enerjiyi elde etmek için, oksijen kullanılmayan bir yol olan glikolizis ile glikojen parçalanıp laktik asite dűnűřtűrűlmekte ve sonuçta kas dokuda laktik asit miktarında artıř gűzlenmektedir [116]. Arsenik grubunda ise, aęır metallerin toksik etkisinden dolayı oluřan kirlilikle ortamda oksijen miktarı azalmaktadır. Bu ortamda canlılıklar yařamsal faaliyetlerini devam ettirebilmeleri için kısıtlı oksijen dűzeyleri ile az enerji űreten metabolik yollara girerler ve bunun için de karbonhidratları sindirerek metabolizmadaki laktik asit seviyesinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca laktat ve pirűvatın birbirlerine dűnűřűműnű iki yűnlű olarak kataliz eden LDH enziminin artıřı da ciddi kas travmalarına ve kas anomalilerinin oluřumuna yol açmaktadır. Deney sonuçlarımızda arsenik uyguladıęımız grupta bu enzimin kanda yűksek dűzeyde gűrűlmesi laktik asit metabolizmasında bir artıřın gűstergesi olarak dűřünülebilir.

Arseniğin suda ve sucul organizmalarda oluşturduğu bu biyokimyasal etkileri ile balığın et kalitesinde ve tazeliğinde istenmeyen oluşumlar meydana getirdiği saptanmıştır. Arsenik+propolis grubu değerlerinin arsenik grubuna göre, kontrol ve propolis grubu değerlerine daha yakın çıkmasının sebebi ise; propolis ilavesi sonucu, ortamdaki arseniğin propoliste bulunan CAPE'ler vasıtasıyla şelatlanarak bağlanmasıyla [50] sudaki oksijenin azalması engellenip su kirliliği önlenerek, oksijenli şartlarda gerçekleşen daha yüksek enerji verici metabolik yollar tercih edilip laktat oluşumunun engellenmesidir.

Grupların kas dokularındaki TVB-N miktarları karşılaştırıldığında, arsenik grubunda arsenik+propolis, propolis ve kontrol grubuna göre anlamlı artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu artışın, arseniğin biyomoleküllere karşı oluşturduğu toksik etki nedeni ile proteinlerin ve nükleik asitlerin yıkımına yol açması ve yapılarındaki azotların serbest hale geçmesinden dolayı olduğu düşünülmektedir.

Stres düzeyinin bir göstergesi olan pH değerlerindeki değişiklikler incelendiğinde, arsenik grubunda diğer uygulama gruplarına göre anlamlı artışların olmasının nedeni ise; arsenik gibi toksik maddelere maruz kalma sonucunda meydana gelen stres ile kaslarda fazla miktarda laktik asit birikmesi sonucu kaslarda oluşan bu laktik asit glukoneogenez ile tekrar metabolizmaya katılır ve bu şekilde laktik asitin kaslardan metabolizmaya girmesi ile kas pH'sı yeniden yükselir.

Arsenik uygulanan canlıların MDA düzeylerindeki artışın temel sebebi, ağır metallerin toksik etkisinden dolayı membranda lipit peroksidasyonun başlatılması ve sonuçta peroksidasyon ürünlerinin artışının gerçekleşmesidir. Bu tür hücresel bozulum reaksiyonlarının kas dokularında meydana gelmesi, özellikle balık eti yapısının bozulması ve tazeliğinin olumsuz etkilenmesi ile sonuçlanmaktadır. Arsenik+propolis grubu değerlerinin kontrole yakın olması ise, arsenik hasarı sonucu meydana gelen peroksidasyonu başlatan serbest radikal üretiminin antioksidan özellikteki propolis tarafından engellenmesinin sonucudur.

Farklı araştırma grupları tarafından yapılan benzer çalışmaların sonuçları da çalışmalarımızın verilerini destekler durumdadır [116-120].

Balıkların mikrobiyal kontaminasyonu; balıkların bakım sürecinde yetiştirildikleri ortamda ve özellikle buzdolabında saklanması esnasında önem arz etmektedir. Çünkü taze balık solungaçlarında ve sindirim sistemi organlarında çok miktarda bakteri içermektedir. Bu nedenle mikrobiyal bozulmanın gerçekleşmesi olayında balık eti yüksek bir potansiyele sahiptir [117].

Yaptığımız çalışmada arsenik ağır metali uygulamasının, balıkların doğal mikroflorasında bulunan mezofilik ve psikrofilik bakteriler üzerinde üremeyi durdurucu etkileri gözlenmiştir. Arsenik, bakterilerde üremeyi durdurucu etki yaparken aynı zamanda bakterinin yaşadığı canlının doku ve organlarına da metabolik zararlar vermekte ve et kalitesini düşürmektedir. Ancak doğal bir antimikrobiyal ajan olan propolisin etkisi, arsenikten daha da fazladır ve bu etkiyi canlı metabolizmasına zarar vermeden göstermektedir. Arsenik+propolis grubunda ise; üremeyi durdurucu etki, arsenik ve propolisin birlikte sinerjik etki göstererek mezofil ve psikrofilik bakteri sayısını istatistiksel olarak önemli düzeyde azaltmıştır. Aynı zamanda arseniğin vücutta oluşturduğu hasarlar uygulanan doğal antiinflamatuar ve antimikrobiyal ajan olan propolisle aza indirgenmiştir ve böylelikle balık etinin kalitesi ve tazeliği korunmuş olur.

Propolis antimikrobiyal etkisini, özellikle yapısındaki kafeik asit ve kafeatlar gibi en önemli bileşenleri aracılığı ile gösterir. CAPE'nin immünomodülatör etki göstererek gram (+) bakteri enfeksiyonlarına karşı profilaktik olarak etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca propolisin yapısındaki sinamik asitin bakterilerdeki glukozil transferaz enziminin aktivitesini baskılaması ile özellikle diş çürümelerine yol açan mikroorganizmalar için antimikrobiyal etki göstermektedir. [46,120]. Elektron mikroskopik ve mikroklorimetrik yöntemlerle yapılan çalışmalara göre, propolisin antimikrobiyal etkisini hücre bölünmesini ve bakteri hücre duvarı oluşumunu engelleyerek oluşturduğu düşünülmektedir [46]. Çalışmalarımıza benzer nitelikteki bazı araştırmalar, analiz sonuçlarımızı desteklemektedir [41,46,49,50,117,122,123].

Çeşitli inorganik ve organik endüstriyel ve evsel atıklar çevrede kirliliğe yol açmaktadır. Parçalanamayan ağır metaller, çevresel devamlılığa ve biyolojik birikim potansiyeline sahip oldukları için sucul ortamlar için oldukça zararlı maddelerdir. Bu nedenle buldukları ortamlarda yaşayan canlıların dokularında histopatolojik

değişimlere yol açmaktadırlar [95]. Solungaçlar gaz değişimi, iyon düzenlenmesi ve metabolik atık ürünlerin boşaltımının sağlandığı temel yapılar olmasından dolayı, balıklar için kritik organlardır. Geniş yüzey alanıyla dış çevreye açılan solungaçlar, aynı zamanda sucul kirleticiler için ilk hedefdir [122].

Yaptığımız çalışma sonucunda, arseniğin toksik etkilerine maruz kalan solungaç dokularında sekonder lamellerde birleşmelerin ve kısalıp kalınlaşmaların olması, hücre kayıplarının meydana gelmesi, vakuol oluşumu, nekroz (Teleangioectasiae), sekonder lamel uçlarının çomaklaşması, sekonder lamellerin birleşmesi ve düzleşerek kaybolması, kıkırdak doku hasarı gibi histopatolojik değişimlerin meydana geldiği görülmüştür. Solungaç dokularında meydana gelen bu hasarların nedeni olarak, solungaçların dış ortamla direk etkileşim halinde olması düşünülebilir [124]. Propolis uygulanan grupta ise yer yer vakuol oluşumunun olduğu görülmüştür. Hem propolis hem de arsenik uygulanan grupta sekonder lamellerin kısalıp kalınlaştığı ve yer yer düzleşmelerin olduğu görülmesine rağmen, arseniğin tek başına kullanıldığı gruba göre daha hafif hücre hasarı gözlenmiştir. Arsenik+propolis grubunda daha az hasar görülmesi, propolisin doku bütünlüğünü koruyarak ve arsenik üzerine şelat yapıcı etkisini kullanarak radikal oluşumu engelleyip oksidatif hasarı en aza indirgeyebilmesi ile açıklanabilir.

Vücutta biyotransformasyonun gerçekleştirildiği ve metabolik depolama işleminin yapıldığı organ karaciğerdir. Önemli bir besinsel değere sahip olan, içinde insanların da bulunduğu birçok canlı tarafından tüketilen ve bu nedenle kalitesinin ve tazeliğinin korunması oldukça önemli olan balık kas dokusu, maruz kaldığı ortamda ağır metallere önemli derecede etkilenebilmektedir. Yaptığımız çalışmada karaciğer ve kas dokularında yapılan histolojik çalışmalar sonucunda arsenik uygulanan canlıların kontrol grubu kas dokuları normal görünüme sahip iken, propolis, arsenik ve arsenik+propolis gruplarında nükleer proliferasyon tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda ise yine kontrol grubu normal görünüme sahip iken, propolis grubunda mononükleer hücre infiltrasyonu, arsenik grubunda konjesyon, hidrofik dejenerasyon ve mononükleer hipertrofi, arsenik+propolis grubunda dokularında konjesyon ve hidrofik dejenerasyon gözlemlenmiştir. Sazanların arsenik ağır metale maruz kalmaları sonucu lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeyinde meydana gelen artışlar ve antioksidan

sistemin önemli bir enzimi olan CAT aktivitesindeki azalmalar hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açarak doku yapısında histopatolojik değişimleri oluşturabileceği düşünülmektedir. Kronik arsenik maruziyetinin oluşturduğu sonuçlar, farklı araştırmacılar tarafından gözlemlenmiş ve bu maruziyetin sonuçları farklı boyutlarda değerlendirilmiştir. Kronik maruziyet sonucu dokularda meydana gelen patolojiler; arseniğin vücutta oluşturduğu toksik etkiden dolayı karaciğer ve kas dokularında bulunan asit fosfataz, alkalin fosfataz, glutamat, pirüvat, transaminaz ve glutamat oksaloasetat transferaz seviyelerine etki etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu enzimlerde meydana gelen bozukluklar doku bütünlüğünü bozmakta ve arseniğe maruz kalan dokularda histopatolojik hasarlar oluşturmaktadır [100].

Arsenik+propolis grubunda arsenik grubuna göre daha az histolojik hasara rastlanması, propolis içeriğindeki major flavonoidlerin, kuersetinin, diğer flavonoidlerin, E vitamini ve histidinin doku yenilemesini hızlandırmasının yanı sıra, radikalleri temizleme özelliğiyle de doku bütünlüğünü koruyucu ve yenileyici etki yaparak hasarları en aza indirdiği düşünülmektedir [46]. Diğer araştırmacılar tarafından yapılan bazı çalışmaların bulguları çalışmamızın sonuçlarına yakın niteliktedir [1,8,124-128].

Ağır metallerin eritrosit morfolojileri üzerine olumsuz etkiler yaptığı bilinmektedir. Buna bağlı olarak gruplarımızın eritrosit morfolojisinde gerek arsenik grubunda gerekse arsenik+propolis ve propolis grubunda herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu durumun arsenik dozunun canlılardaki eritrosit morfolojileri üzerinde kronik bir etki oluşturmamasından ya da maruziyet süresinin hasara neden olacak kadar uzun süreli olmamasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Yang ve arkadaşlarının sazanlarda biyokimyasal parametreler ve eritrosit morfolojileri üzerine galyumun etkilerini incelediği bir çalışmada; sazanlara 2.0, 4.0 ve 8.0 mg l⁻¹ galyum uygulanmış ve 28 gün maruziyet devam etmiştir. Çalışma sonrası incelemelerde yüksek miktarda galyuma maruz kalan (4.0 ve 8.0 mg l⁻¹) balıkların eritrosit morfolojilerinde eritrositlerin dış yapılarında bozulma ve sitoplazmalarını kaybetme sürecine girdiği gözlemlenmiştir [103]. Sonuçlarımızda arseniğin eritrosit morfolojileri üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmamasının nedeni olarak uygulanan ağır metalin türünün, maruziyet süresinin ve dozunun farklı oluşları düşünülebilir.

Çalışmamızda, yaşadığı sucul ortamlarda ağır metale maruz kalan ve insan diyeti için önemli bir kaynak olmakla beraber ekosistemde meydana gelen farklılıklardan ilk sırada etkilenen canlılardan biri olan sazan balığı materyalini kullanarak, propolisin doğal bir antioksidan olarak bu hasarları en aza indirdiğini vurgulamak istedik. Çünkü sucul ortamlara giren ağır metaller hem sucul canlılar için hem de sucul canlıları tüketen diğer canlılar için büyük tehlike arz etmektedir. Günümüzde bilim adamları, ekosistemde meydana gelen olumsuzlukları gerek ekolojik dengeyi korumak adına, gerekse kullandıkları doğal olmayan maddelerin beklenmeyen zararlı etkilerini ve doğadaki olası biyobirikimlerinin başka bir soruna neden olmaması adına artık daha doğal yollarla bu olumsuzlukları önleme ve giderme arayışına girmişlerdir. Bu bilgileri göz önünde bulundurarak içeriğindeki antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve terapötik özellikler gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip bileşiklerin, özellikle flavonoidler ve CAPE'lerin bu hasar giderici etkiyi yapabileceğine dikkat çekmek istedik. Biz de bu bilgiler ışığında, arsenik ile indüklenen sazan balıklarında propolisin hematolojik, biyokimyasal, mikrobiyolojik ve histolojik değişimler üzerine etkisini araştırmış bulunmaktayız. Sonuçlarımızda da görülmektedir ki; belli dozda uygulanan propolisin ağır metallerin hasar verici etkilerini en aza indirdiği ve canlı metabolizmasını zarar verici etkilerden korumada önemli bir rol oynadığını söyleyebilmek mümkündür. Ancak propolis ve propolis içeriğindeki bileşenlerin farklı coğrafik alanlarda ve bitki örtülerinde çeşitlilik göstermesi itibarıyla, propolisin gösterdiği biyolojik aktiviteler ve etkiler de buna bağlı olarak değişebilmektedir. Fakat oran olarak, propolis bileşenleri her ne kadar değişkenlik gösterse de içeriğindeki aktif maddelerin etkisi çok büyük farklılıklar arz etmemektedir. Özellikle temel biyoflavonoidlerin propolisin antioksidan, terapötik ve antimikrobiyal özelliklerini göstermesinde büyük katkısı olduğu tarafımızca yapılan çalışmalarda da sazanlar üzerinde arsenikle oluşturulan toksik etkinin giderimi sonucu saptanmış olmaktadır. Bu çalışma sonucunda elde edilen verilerin, gelecekte de devam edecek olan çeşitli doğal terapötiklerin farklı canlı grupları özellikle sucul organizmalar üzerine etkilerinin gözlenmesinde yapılacak olan birçok araştırma ve araştırmacı için de yol gösterici nitelikte olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Murphy, R.C., Free-radical-induced oxidation of arachidonoly plasmalogen phospholipits: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanides, *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 463, 2001.
- [2] Özmen, H., Su kirliliğini kimyasal olarak belirleme yöntemleri ve kirlilik parametreleri, tarım ve köy işleri bakanlığı koruma ve kontrol genel müdürlüğü su kirliliği hizmet içi eğitim semineri notları, Elazığ, 175- 182, (12-14 Mayıs) 1998.
- [3] Strmach, M. and Braunbeck, T., Isolated hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a tool to discriminate between differently contaminated small river system, *Toxicol. In Vitro*, 14, 361- 377, 2000.
- [4] Lendhardt, M., Seasonal changes in some blood chemistry parameters and in relative liver and gonad weights of pike (*Essox lucius*) from River Danube, *J. Fish Biol.*, 40, 709-718, 1992.
- [5] Arda, M., Balıklarda bakteriyel, mantar, viral ve ekolojik nedenlerden ileri gelen hastalıklar ve tedavileri, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Yayınları, Ankara, 300, 1974.
- [6] Eraslan, G., Kanbur, M. ve Silici, S.. Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium xuoride. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 273–283, 2007.
- [7] Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., Routine haematological methods for use with fish blood, *J. Fish Biol.*, 5, 771-781, 1973.
- [8] Landis, G.W. and Yu, M.H., *Heavy Metals*, Environ. Toxicol., Lewis Pub., USA. 171, 1999.
- [9] Kathryn, R.M., Robert, P.C. and Rebecca, A.J., Methylmercury and omega-3 fatty acids: co-occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. *Environmental Research*, 107, 20–29, 2008.
- [10] Çatla, M. ve Girgin, A., Ağır metallerin balıklar üzerindeki etkileri, T.C. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü Su Kirliliği Hizmet İçi Eğitim Semineri, Elazığ, 151-157, Mayıs, 1998.
- [11] Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A. ve Timur, S., Metallerin Çevresel Etkileri-I, www.metalurji.org.tr, Nisan, 2004.
- [12] Yağmur, F. ve Hancı İ. H., Arsenik, *Sted*, 7, 250, 2002.

- [13] Rodr'iguez, V.M., Jim'enez-Capdeville, M.E. and Giordano, M., The effects of arsenic exposure on the nervous system, *Toxicology Letters*, 145, 1–18, 2003.
- [14] Villa-Lojo, M.C., Alonso-Rodri'Guez, E., Lo'pez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S. and Prada-Rodri'Guez, D., Coupled high performance liquid chromatography–microwave digestion–hydride generation–atomic absorption spectrometry for inorganic and organic arsenic speciation in fish tissue, *Talanta*, 57, 741–750, 2002.
- [15] Abja, P.M. and Albertini, R., Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins, *Clinica Chemia Acta*, 306, 1-17, 2001.
- [16] Mayne, S.T., Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiological research, *J. Nutr*, 133, 933- 940, 2003.
- [17] Bergendi, L. Benes, L., Duraekova, Z. and Fereneik, M., Chemistry, physiology and pathology of free radicals, *Life Sciences*, 65, 1865-1874, 1999.
- [18] Merker, K. and Grune, T., Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence, *Exp Gerontol*, 35, 779-786, 2000.
- [19] Lam, C.W., Free radicals, nutritional anti-oxidants and trace elements, Adapted from Dr Mano Arumanayagam's Lecture Notes, 2000.
- [20] Budak, Ő., Acar, T., Karakayalı, Ő., Paşaoğlu, H., AŐıkđöz, S., DemirbaŐ, B. ve Aydın, R., Akut batınlarda peritoneal sıvıda malondialdehit (MDA) d'zeyi 'l'ç'ümü, *Ulusal Travma Dergisi*, 8, 22-25, 2002.
- [21] Deaton, C.M. and Marlin, D.J., Exercise associated oxidative stres, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2, 278-291, 2003.
- [22] Beckman, JS., Chen, J., Ischiropoulos, H. and Crow, J.P., Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol*, 40, 229-233, 1994.
- [23] Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G., Nogueira, C.W. and Rocha, J.B.T., Protective role of arkyldiselenides on lipid peroxidation, *Enciron. Res.*, 94, 276-282, 2004.
- [24] Erden, M., Serbest radikaller. *T. Klin. Tıp Bilimleri Dergisi*, 12, 201-207, 1992.
- [25] Kumbul, K., Deneysel intestinal iskemi ve reperfüzyon modelinde caffeic acid phenethyl ester'in akciğer hasarını önlemedeki etkinliği, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak'ültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Isparta, 2007.

- [26] Di Mascio, P., Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyntirite with hidrogen peroxide, FEBS Letter, 355, 287-289, 1994.
- [27] Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford University Pres, UK, 1999.
- [28] Keha, E. ve Küfrevioğlu, Ö.İ., Enzimler, Biyokimya Kitabı, Derya Yayınevi, Trabzon, 2, 89, 1993.
- [29] Çimen, Ç., Öter, Ç., Demir, H. ve Savran, A., Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 16, 15-20, 2005.
- [30] Alvyng, A., Carson, P., Flanagan, C.L. and Ickes, C., Enzymatic deficiency in primaquin-sensitive erythrocytes. Science, 14, 484-485, 1956.
- [31] Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C., Free radicals in biology and medicine, 2nd Clarendon Pres., Oxford, 1989.
- [32] Ohno, H., Matsuura, N. and İshikawa, M., Serum Mn-SOD in patients with diabetes mellitus and thyroid dysfunction as judged by an ELISA. Horm. Metab. Res. 23, 449-451, 1991.
- [33] Sugawara, M. and Kita, T., Deficiency of superoxide dismutase endemic goiter tissue. J. Clin Endoc and Metabol. 67, 1156-1161, 1988.
- [34] Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. and Canli, M., Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*, Comparative Biochemistry and Physiology, 143, 218–224, 2006.
- [35] Demir, H., Alkan, S. ve Savran, A., Sığır karaciğerinden saflaştırılan katalaz enzimi üzerinde bazı ilaçların inhibisyon kinetiğinin incelenmesi, XVIII. Ulusal Kimya Kongresi, Kars, 500, 2004.
- [36] Demir, H., Akkoyun, H.T., Çimen, Ç. ve Çelik, İ., İnsan eritrositlerinden ve rat eritrositlerinden katalaz enzimi aktivitesi üzerinde bazı ilaç ve antibiyotiklerin (*in vivo*) inhibisyon kinetiğinin incelenmesi. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniversitesi, 21–24 Haziran, Adana, 2004.
- [37] David, M., Munaswamy, V., Halappa, R. and Marigoudar, S. R., Impact of sodium cyanide on catalase activity in the freshwater exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus),. Pesticide Biochemistry and Physiology, 92, 15–18, 2008.

- [38] Wheeler, C.R. and Salzman, J.A., Automated assay for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activity. *Anal Biochem.* 184, 193-199, 1990.
- [39] Eroğlu, H.E., Tatlışen, A. ve Özkul, Y., Mesane kanserli doku kültürlerindeki mikronukleous üzerine propolis ve mitomisin-c'nin etkileri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (E.Ü. Journal of Health Sciences)*, 13, 15-20, 2004.
- [40] Chu, W.H., Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*), *Fish and Shellfish Immunology*, 21, 113-117, 2006.
- [41] Marcucci, M.C., Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie*, 26, 83-99, 1995.
- [42] Seven, İ., Aksu, T. ve Seven P.T., Propolis ve hayvan beslemede kullanımı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 18, 79-84, 2007.
- [43] Girgin, G., Baydar, T., Tüylü, A.O., Sorkun, K., Salih, B. ve Şahin, G., Effect of various propolis on erythrocyte superoxide dismutase and catalase activities: A preliminary study. *Abstracts/ Toxicology Letters*, 164, 138, 2006.
- [44] Kumova, U., Korkmaz, A., Avcı, B.C. ve Ceyran, G., Önemli bir arı ürünü: Propolis, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 10-23, Mayıs, 2002.
- [45] Burdock, G. A., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363, 1998.
- [46] Hepşen, İ.F., Tilgen, F., Er, H., Propolis: tıbbi özellikleri ve oftalmolojik kullanımı, *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 3, 386-391, 1996.
- [47] Biray, Ç., Gündüz, C., Yılmaz, B., Şahin, F. ve Topçuoğlu, N., Propolis ve etken maddeleri olan kafeik asit fenetil ester (CAPE) ve sinamik asitin, insan T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre dizisi (CCRF-CEM)'de sitotoksik ve apoptotik etkinliğinin değerlendirilmesi. *Ege Tıp Dergisi*, 45, 83-92, 2006.
- [48] Kanbura, M., Eraslıana, G. and Silici, S., Antioxidant effect of propolis against exposure to propetamphos in rats, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 909-915, 2009.
- [49] Burak, M. ve Çimen, Y., Flavonoidler ve antioksidan özellikleri. *Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, 296-304, 1999.

- [50] Geckil, H., Ateş, B., Durmaz, G., Erdoğan, S. and Yılmaz, İ., Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. 1, 27-31, 2005.
- [51] Özyurt, B., Özyurt, H., Atış, Ö., Akbaş, A., Yılmaz, H.R. and Söğüt, S., Deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisinde E vitamini ve kafeik asit fenetil esterinin akciğer bazı metabolik enzimlere etkisi. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 4, 14-18, 2006.
- [52] Kaynak Propolis: <http://www.tarimsalpazarlama.com/makale.php?idü8303>. 26 Aralık 2008 Cuma.
- [53] Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. and Popov, S., Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis from different geographic origin, *J Ethnopharmacol*, 6, 235–240, 1999.
- [54] Kaynak propolis: <http://www.hekimce.com/index.php?kiid=240>, 12 Aralık 2008.
- [55] Erdemli A.Ü., Balık biyolojisi ve balık eti parametreleri, Ders Notları, İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Malatya, 2001.
- [56] Yakar, K., Fiziyojji, Nobel yayın evi, Ankara, 6, 213-215, 2005.
- [57] Noyan, A., Yaşamda ve hekimlikte fiziyojji, Ankara, 8, 492, Ocak, 1993.
- [58] Erdemli, A.Ü., Su ürünlerinde özel konular, dersnotları, İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Malatya, 2002.
- [59] Beltiz, H.D., Grosh, W., Schieberle, P., *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, Springer Verlag, D- 69126 Heidelberg, Deutschland, 2001.
- [60] Demir, N., İhtiyoloji, İ.Ü. Yayınları, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 219, 116-117, 1992.
- [61] Trenes, W., *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*, 2. Aufl., Behr's Verlag, Hamburg, 1994.
- [62] Kuru, M., Omurgalı Hayvanlar, Fen ve mühendislik serisi, Palme Yayıncılık, Ankara, 5, 145, 1999.
- [63] Demirsoy, A., Yaşamın temel kuralları omurgalılar-amniota, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Beytepe/Ankara, 1993.
- [64] Güneş, Ö., Erbaycu, A.E., Çakan, A., Örmən, M., Özsöz, A. ve Önvural, B., Plevra sıvılarında malondialdehit düzeyinin tanısal değeri, *Solunum*, 5, 213-219, 2003.
- [65] Southorn, A.P. and Powis, G., Free radicals in medicine I. Chemical nature and biolojic reactions, *Mayo Clin. Proc.*, 63, 381-389, 1988.
- [66] Slater, F.T., Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, 222, 1-15, 1984.

- [67] Arda, M., Temel mikrobiyoloji, Medisan Yayınevi, Ankara, 2000.
- [68] Schknk, D., Wolford, L., Chelius, M., J., Steeuens and K.M. Chan, Effects of arsenite, arsenate and the herbicide monosodium methyl arsonate (MSMA) on hepatic metallothionein expression and lipid peroxidation in channel catfish,. *Camp. Biochem. Physiol.* 2, 177-183, 1997.
- [69] Hatting. J., The effects of tricaine methanesulfatone (M.S.-222) on the microhematokrit of fish blood, *J. Fish Biol.*, 10, 453-455, 1975.
- [70] Hoffman G.L. 1977 *Methods For the Diagnosis Of Fish Discatep*. Fish Forming Exeperiment Station U.S. Fish And Wilt Fish Service, Statpart, Arkensap.
- [71] Hofmann, R. and Lommel, R., Effects of repcated blood sampling on- some blood pananeters in freshwater fish, *F.J. Fish Blood*, 24, 245-251, 1984.
- [72] Ezzat, A.A., Shabana, M.B. and Farghaly, A.M., Studies and blood characteristic of *Tilapia zilli* (Gervais), *J. Fish Biol.* 6, 1-12, 1973.
- [73] Kocabatmaz, M.H. ve Ekingen G., Değişik tür balıklarda kan örneği alınması ve henatolojik metodların standardizasyonu, *Doğa Bil. Der.* 2, 149-159, 1982.
- [74] Kontz, G.W., Fish hematology Tec. in fish immunology 3, 121-130, 1994.
- [75] Lowry, O., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurements with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1956.
- [76] Luck H., Catalase, *Methods of enzymatic Analysis*, 885-888, 1963.
- [77] Beuge, J.A. and Aust, S.D., Microsomal lipid peroxidation, *Methods in Enzimology*, 52, 302-310, 1978.
- [78] Bancroft, J.D., Stevens, A., Turner, D.R. *Theory of practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, 1990.
- [79] Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H., *Laboratory methods in histotechnology*, Armed forces institute of pathology, Washington, 1992.
- [80] Kiernan, J.A., *Histological and histochemical methods theory and practice*, Pergaman Pres., Oxford, 1981.
- [81] Akay, M.T., Genel histoloji atlası, Palme yayın, 14, 4, 2007.
- [82] Metin, S., Erkan, N., Varlık, C., Özdem, Ö., ve Baygan, T., Marine gökkuşağı alabalığının modifiye atmosferle paketlenerek depolanması sırasında bazı kriterlerde meydana gelen değişimler, *Gıda Bilimi Teknolojisi Ve Teknolojisi Dergisi*, 5, 56-64, 2000.

- [83] Gülyavuz, H., Ünlüsayın, M., Su ürünler işletme teknolojisi, S.Ü. Egridir Su Ürünleri Fakültesi, Isparta, 1999.
- [84] Anonymous, Gıda sanayinde mikrobiyolojik kalite kontrol eğitim programı, Tübitak-Mam., Gıda Soğutma Teknolojileri Bölümü, Gebze-Kocaeli, 1990.
- [85] Caggiano, M., Quality in harvesting and post-harvesting procedures-influence on quality, fish freshness and quality assessment for sea bass and sea bream, global quality assessment in mediterranean aquaculture Zaragoza, CIHEAM- IAMZ, 149, 2000.
- [86] Schormuller, J., Handbuch der Lebensmittel Chemie. Band IV. Fette und Lipide (LIPIDS). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1969.
- [87] Schormuller, J. Handbuch der Lebensmittel Chemie. Band III/2 Teil. Springer-Verlag, Berlin, 1482, 1968.
- [88] Keller, J.E., Skelley, G.C. and Acton, C.J., Effect of meat particle size and casing diameter on summer sausage properties during drying, J. Milk Food Technol., 37, 101-103, 1974.
- [89] Ockerman, H.W. Quality control of post-mortem muscles tissue, 13th Ed., The Ohio State University, Columbus, 1985.
- [90] Bharucha, C., Meyer, H., Moody, A. and Carman, R.H., Handbook of Medical Laboratory Technology, Wesley Press, Mysore, India, 1976.
- [91] Kampen, E.J.V. and Zijlstra, W.G., Standardisation of hemoglobinometry II. The hemoglobincyanide method. Clin. Chem. Acta, 6, 538-44, 1961.
- [92] Palaniappan, P.R., and Vijayasundaram, V., FTIR study of arsenic induced biochemical changes on the liver tissues of fresh water fingerlings *Labeo Rohita*, Romanian J. Biophys., 18, 135–144, 2008.
- [93] Shah, A.Q., Kazi, T.G., Arain, M.B., Jamali, M.K., Afridi, H.I., Jalbani, N., Baig, J.A. and G.A., Kandhro, Accumulation of arsenic in different fresh water fish species-potential contribution to high arsenic intakes, Food Chemistry 112, 520–524, 2009.
- [94] Atli, G., Alptekin, Ö., Tükel, S. and Canli, M., The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review, Food Chemistry 71, 235-239, 2000.
- [95] Seven, A., ve Candan, G., Radikali ve lipid peroksi düzeyini artıran etkenler, Biyokimya Dergisi, 4, 43-56, 1995.

- [96] Sare, M., Hamamci, D., Yilmaz, I., Birincioğlu, M., Menten, B.B., Özmen, M., and Yesildag, Ö., Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radical formation in lung and liver tissues, *Surg. Endosc.*, 16, 88-192, 2002.
- [97] Wasowicz, W., Neve, J., and Peretz, A., Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbuturic acid-reactive substance in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage, *Clin. Chem.*, 39, 2522-2526, 1993.
- [98] Duran, A., and Talas, Z.S., Biochemical changes and sensory assessment on tissues of carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus 1758) during sale conditions, *Fish Physiol Biochem*, 35, 709–714, 2009.
- [99] Newairy, A.A., Salama, A.F., Hussien, H.M. and Yousef, M.I., Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats, *Food and Chemical Toxicology* 47, 1093–1098, 2009.
- [100] Humtsoe, N., Davoodi, R., Kulkarni, B.G., and Cavan, B., Effect of arsenic on the enzymes of the rohu carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822), *The Raffles Bulletin of Zoology*, 14, 17-19, 2007.
- [101] Desai, V.G., Casciano, D., Feuers, R.J., and Aidoo, A., Activity profile of glutathione-dependent enzymes and respiratory chain complexes in rats supplemented with antioxidants and treated with carcinogens, *Arch. Biochem, Biophys.*, 394, 2001.
- [102] Edenharder, R., Von Petersdorff, I., and Rauscher, R., Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazol [4,5-f] quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food, *Mutat Res.*, 287, 261-74, 1993.
- [103] Yang, J.L. and Chen, C., Effects of gallium on common carp (*Cyprinus carpio*): acute test, serum biochemistry, and erythrocyte morphology, *Chemosphere*, 53, 877–882, 2003.
- [104] Talas, Z.S. and Gülhan M.F., Effects of various propolis concentrations on biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1994-1998, 2009.
- [105] Çelik, E.Ş., Balıkların kan parametreleri üzerine ağır metallerin etkisi, *E. U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 23, 49-55, 2006.
- [106] Meteoğlu, İ., Çağlayan, O. ve Koçyiğit, A., *Klinik biyokimya laboratuvarı el kitabı*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 148-149, 2007.

- [107] Orun, I. and Talas, Z.S., Antioxidative role of sodium selenite against the toxic effect of heavy metals (Cd^{+2} , Cr^{+3}) on some biochemical and hematological parameters in the blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*), Fresenius Environmental Bulletin, 1242-1246, 2008.
- [108] Fuliang, H.U., Hepburn, H.R., Xuana, H., Chen, M., Daya, S., Radloff, S.E., Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus, Pharmacological Research, 51, 147–152, 2005.
- [109] Ayaz, A., Tuz tüketimi ve sağlık, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara, 8, 2008.
- [110] Ursel, A., Natural care–Vitamins & Minerals Handbook, Dorling Kindersley, London, 2001.
- [111] Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Zanini, R., Amaral, F., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., Changes in hematological and serum biochemical values in jundia´ *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. Chemosphere 69, 920– 926, 2007.
- [112] Swaran, J.S., Flora, S.B., Satish, C. P., Dhaked, R. K., Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats. Life Sciences 77, 2324–2337, 2005.
- [113] Kayhan, F.E., Muşlu, M.N. ve Koç, N.D., Bazı Ağır Metallerin Sucul Organizmalar Üzerinde Yarattığı Stres Ve Biyolojik Yanıtlar. Journal of Fisheries Sciences. 3, 153-162, 2009.
- [114] Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Corre, C.F., Mazon, A.F., Araujo, M.R.R., Moraes, G. and Rantin F.T., Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Collossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, 133, 375–382, 2002.
- [115] Nunes, A.C., Mathias, M.L. and Crespo, A.M., Morphological and haematological parameters in the Algerian Mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals.. Environmental pollution, 113, 87-93, 2001.
- [116] Stien, L.H., Hirmas, E. Bjornevik, M., Karlsen, O., Nortvedt, R., Rora, A.M.B., Sude, J. and Kiessling, A., The effects of stres and temperature on the colour and texture of pre-rigor filleted farmed cod (*Gladus morhua L.*), Aquacult. Res., 36, 1197-1206, 2005.

- [117] Duran, A., Erdemli, Ü., Karakaya M., and Yılmaz, M.T., Effects of slaughter methods on physical, biochemical and microbiological quality of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and mirror carp *Cyprinus carpio* filleted in pre-, in- or post-rigor periods. *Fisheries Science*, 74, 1146-1156, 2008.
- [118] Osorio, M.T., Zumalacarregui, J.M., Cabeza, E.A., Figueria, A. and Mateo, J., Effect of rearing system on some meat quality traits and volatile compounds of suckling lamb meat, *Small Ruminant Research*, 78, 1-12 2008.
- [119] Ruff, N., Fitzs G.R.D., Cross, T.F., Tuertie, G. and Kerry, J.P., Slaughtering method and α - tokopheryl acetate supplementation affect rigor motris and filet shelf-life of turbot *Scophthalmus maximus* L., *Aquac. Res.*, 33, 703-714, 2002.
- [120] Geay, Y., Bauchart, D., Hocquette, J.F., and Culioli, J., Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.*, 1-26, 2001.
- [121] Choi, Y.M., Noh, D.O., Cho, S.Y., Suh, H.J., Kim, K.M., Kim, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea, *LWT* 39, 756–761, 2006.
- [122] Matyar, F., Kaya, A., Dincer, S., Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey.. *Science of the Total Environmental* 407, 279-285, 2008.
- [123] Jeon, H.J., Yi, S.C., Oh, S.G., Preparation and antibacterial effects of Ag–SiO₂ thin films by sol–gel method.. *Biomaterials*, 24, 4921–4928, 2003.
- [124] Monterio, S.M., Rocha, E., Mancera, J.M., Fernandes, A.F. and Sousa, M., A sterological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 213-223, 2009.
- [125] Pandey, S., Parvez, S., Ansaria, R.A., Ali, M., Kaur, M., Hayat, F., Ahmad, F. and Raisuddin, S., Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch, *Chemico-Biological Interactions*, 174, 183–192, 2008.
- [126] Kelly, J., Janz, D., Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill, *Aquatic Toxicology*, 92, 240-249, 2009.

- [127] Mishra, A.K., Mohanty, B., Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26, 136–141, 2008.
- [128] Roy, S. and Bhattacharya, S., Arsenic- induced histopathology and synthesis of stress proteins in liver and kidney of *Channa punctatus*, *Ecotoxicology and environmental safety*, 65, 218-229, 2006.