

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAKIR SÜLFAT VE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİNİN
Oreochromis niloticus'TA HEMATOLOJİ, PLAZMA
BİYOKİMYASI VE DOKU OKSİDATİF STRES DURUMLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

RABİA EROL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2020

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BAKIR SÜLFAT VE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİNİN *Oreochromis niloticus* TA HEMATOLOJİ, PLAZMA BİYOKİMYASI VE DOKU OKSİDATİF STRES DURUMLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabia EROL

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez 19/06/2020 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özgür FIRAT
Danışman

Doç. Dr. Rıza BİNZET
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hasan KARADAĞ
Üye

Doç. Dr. Tayfun SERVİ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu'ndaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAKIR SÜLFAT VE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİNİN *Oreochromis niloticus*'TA HEMATOLOJİ, PLAZMA BİYOKİMYASI VE DOKU OKSİDATİF STRES DURUMLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabia EROL

Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Özgür FIRAT
Yıl : 2020, Sayfa sayısı: 70

Jüri : Doç. Dr. Özgür FIRAT
Doç. Dr. Rıza BİNİZET
Dr. Öğr. Üyesi Hasan KARADAĞ

Sunulan çalışmada bakır sülfat (CuSO₄) ve bakır oksit nanopartiküllerin (CuO-NP) toksik etkileri *Oreochromis niloticus*'ta fizyolojik ve biyokimyasal biyobelirteçler kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla balıklar 4 ve 21 günlük sürelerle 0.05 mg/L CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisine bırakılmış ve hematolojik, plazma biyokimyasal ile solungaç ve karaciğer oksidatif stres parametreleri ölçülmüştür. Her iki bakır formunun etkisinde eritrosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit düzeyleri azalırken (P<0.05); lökosit sayısı önemli bir değişim göstermemiştir (P>0.05). CuSO₄ ve CuO-NP plazma alanin aminotransferaz, aspartate, aminotransferaz ve alkalen fosfataz enzim aktiviteleri ile kortizol ve glukoz düzeylerini arttırmıştır (P<0.05). Hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP etkisinde süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde karaciğer ve solungaç dokularında glutatyon peroksidaz aktivitesinde ise karaciğerde azalış belirlenmiştir (P<0.05). Test edilen bakır formlarına yanıt olarak glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz aktivitesi 4. günde her iki dokuda artış 21. günde ise karaciğerde azalış göstermiştir (P<0.05). Hem solungaç hem de karaciğerde CuSO₄ ve CuO-NP, glutatyon düzeyinde 4. günde artış 21. günde azalışa; malondialdehit düzeylerinde ise son etkileşim süresi sonunda artışa neden olmuştur (P<0.05). Sonuç olarak sunulan araştırma her iki bakır formunun da *O. niloticus* için hematoksik olduğunu ve dokularda oksidatif strese yol açtığını göstermektedir. Araştırma sonuçlarımızı dikkate aldığımızda *O. niloticus*'ta CuSO₄ ve CuO-NP'nin benzer toksik etkiler gösterdiği; bununla birlikte, CuO-NP'nin toksik etkilerinin biraz daha fazla olduğu ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: *Oreochromis niloticus*, Bakır Sülfat, Bakır Oksit Nanopartikülleri, Hemato-biyokimyasal Parametreler, Antioksidanlar

ABSTRACT

MSc Thesis

BAKIR SÜLFAT VE BAKIR NANOPARTİKÜLLERİNİN *Oreochromis niloticus*'TA HEMATOLOJİ, PLAZMA BİYOKİMYASI VE DOKU OKSİDATİF STRES DURUMLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabia EROL

Adiyaman University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Özgür FIRAT
Year : 2020 , Number of pages: 70

Jury : Assoc. Prof. Dr. Özgür FIRAT
Assoc. Prof. Dr. Rıza BİNİZET
Asst. Prof. Dr. Hasan KARADAĞ

In the presented study, toxic effects of copper sulphate (CuSO₄) and copper oxide nanoparticles (CuO-NP) were evaluated using physiological and biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus*. For this purpose, fish were exposed to 0.05 mg / L CuSO₄ and CuO-NP for 4 and 21 days, and parameters of hematological, plasma biochemical, gill and liver oxidative stress were measured. Under the effect of both copper forms while the erythrocyte number and hemoglobin and hematocrit levels decreased (P<0.05); leukocyte number count did not change significantly (P>0.05). CuSO₄ and CuO-NP increased plasma alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase enzyme activities and cortisol and glucose levels (P<0.05). Under both CuSO₄ and CuO-NP effects it was determined decreases in superoxide dismutase and catalase activity of liver and gill tissues and in the liver glutathione peroxidase activity (P<0.05). In response to the tested copper forms, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activity increased in both tissues at 4 days and decreased in the liver at 21 days (P<0.05). In both gill and liver CuSO₄ and CuO-NP caused elevation at 4 days and decline at 21 days in glutathione levels, however, they increased malondialdehyde levels at the end of the exposure period (P<0.05). Consequently, the present study shows that both copper forms are hematoxic to *O. niloticus* and cause oxidative stress in tissues. When we consider our research results, it can be stated that CuSO₄ and CuO-NP show similar toxic effects in fish; however, the toxic effects of CuO-NP are slightly more in *O. niloticus*.

Key Words: *Oreochromis niloticus*, Copper Sulphate, Copper Oxide Nanoparticles, Hemato-biochemical Parameters, Antioxidants

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FEFYL/2018-0002 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BEYAN

“Bakır Sülfat ve Bakır Nanopartiküllerinin *Oreochromis niloticus*'ta Hematoloji, Plazma Biyokimyası ve Doku Oksidatif Stres Durumları Üzerine Etkileri” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Rabia EROL

imza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında güler yüzünü, bilgi, birikim ve yardımlarını esirgemeyen, her zaman yol gösteren, motivasyonumu arttıran, sonsuz sabır ve bilimsel yaklaşımlarıyla destek olan, çok değerli danışman hocam Sayın Doç.Dr. Özgür FIRAT'a en samimi duygularıyla saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hayvan Ekofizyolojisi laboratuvarının tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Saygıdeğer Hocam Prof.Dr. Ferit KARGIN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca deneysel çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Sayın Prof.Dr. Hikmet Yeter ÇOĞUN, Dr.Öğr.Üyesi Özge FIRAT ve Öğr.Gör.Dr. Tüzün AYTEKİN'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanma aşamasında yardım ve desteklerini her zaman hissettiğim ve akademik bilgisiyle destekleyen kardeşlerim Deniz ŞAHİN ve Ayşe ŞAHİN'e, akademik ve teknik bilgisi ile tezime her türlü desteği veren Dr. Hüseyin EROL'a, en büyük destekçim, yol arkadaşım sevgili eşime ve biriciklerim kızım ve oğluma en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Biyokimyasal Analizler.....	15
3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Biyokimyasal Analizler.....	16
3.2.2.1. Homojenatların Hazırlanması.....	16
3.2.2.2. CAT Aktivite Tayini.....	16
3.2.2.3. SOD Aktivite Tayini.....	18
3.2.2.4. GPX Aktivite Tayini.....	19
3.2.2.5. GST Aktivite Tayini.....	20
3.2.2.6. GR Aktivite Tayini.....	22
3.2.2.7. GSH Düzeyi Tayini.....	23
3.2.2.8. MDA Düzeyi Tayini.....	25
3.2.2.9. Protein Düzeyi Tayini.....	26
3.3. İstatistik.....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Hematolojik Parametreler.....	29
4.1.1. Eritrosit.....	29
4.1.2. Lökosit.....	30
4.1.3. Hemoglobin.....	30
4.1.4. Hematokrit.....	31
4.2. Plazmanın Biyokimyasal Parametreleri.....	32
4.2.1. ALT.....	32
4.2.2. AST.....	32
4.2.3. ALP.....	33
4.2.4. Kortizol.....	34
4.2.5. Glukoz.....	35
4.3. Oksidatif Stres Parametreleri.....	35
4.3.1. CAT.....	35
4.3.2. SOD.....	36
4.3.3. GPX.....	37
4.3.4. GR.....	38

4.3.5. GST	39
4.3.6. GSH.....	40
4.3.7. MDA.....	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	43
KAYNAKLAR	55
KİŞİSEL BİLGİLER	68
EKLER.....	69
Ek 1. Etik Kurul Kararı	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Deney ortam suyunun fizikokimyasal özellikleri.....	14
Çizelge 3.2	Süperoksit Dismutaz Yöntemi.....	18
Çizelge 3.3	Glutasyon Peroksidaz Yöntemi.....	20
Çizelge 3.4	Glutasyon S-Transferaz Yöntemi.....	21
Çizelge 3.5	Glutasyon Redüktaz Yöntemi.....	22
Çizelge 3.6	Redükte Glutasyon Yöntemi.....	24
Çizelge 3.7	Protein Yöntemi.....	27
Çizelge 4.1	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un eritrosit sayısı (10 ⁶ /µL) üzerine etkileri.....	29
Çizelge 4.2	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un lökosit sayısı (10 ³ /µL) üzerine etkileri.....	30
Çizelge 4.3	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un hemoglobin düzeyi (g/dL) üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.4	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un hematokrit düzeyi (%) üzerine etkileri.....	31
Çizelge 4.5	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un plazma ALT aktivitesi (U/L) üzerine etkileri.....	32
Çizelge 4.6	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un plazma AST aktivitesi (U/L) üzerine etkileri.....	33
Çizelge 4.7	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un plazma ALP aktivitesi (U/L) üzerine etkileri.....	34
Çizelge 4.8	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un plazma kortizol düzeyi (ng/dL) üzerine etkileri.....	34
Çizelge 4.9	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un plazma glukoz düzeyi (mg/dL) üzerine etkileri.....	35
Çizelge 4.10	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri.....	36
Çizelge 4.11	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku SOD aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri.....	37
Çizelge 4.12	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku GPX aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri.....	38
Çizelge 4.13	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku GR aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri.....	39
Çizelge 4.14	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku GST aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri.....	40
Çizelge 4.15	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku GSH düzeyi (µmol/g protein) üzerine etkileri.....	41
Çizelge 4.16	CuSO ₄ ve CuO-NP'nin <i>O. niloticus</i> 'un doku MDA düzeyi (nmol/mg protein) üzerine etkileri.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Nanopartiküllerin boyut karşılaştırılması.....	2
Şekil 3.1 Standart protein grafiği	27

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	: Gram
L	: Litre
mg	: Miligram
ppm	: mg/L
µg	: Mikrogram

Kısaltmalar

ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
CAT	: Katalaz
CuSO ₄	: Bakır (II) Sülfat
CuO-NP	: Bakır Oksit Nanopartikülleri
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikasit
GPX	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
MDA	: Malondialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz

1. GİRİŞ

Denizler ve nehirler gibi çoğu aquatik ortamlar doğal ve antropojenik kaynaklardan gelen kirleticiler tarafından kirletilmektedir. Son yıllarda aquatik ortamlar üzerine ağır metallerin etkileri ciddi bir sorun haline gelmiştir ve bu metaller sucul ekosistemlerdeki esas kirleticiler olarak dikkate alınmaktadır [1]. Özellikle de endüstriyel ve tarımsal atıkların oluşumuna neden olan nüfus ve insan aktivitesindeki artış sucul ortamlara giren kirletici düzeylerini de arttırmaktadır ki bu kirlilik sucul organizmalar üzerinde ciddi toksik etkilere neden olmaktadır [2]. Bu tehlikeli kimyasalların suya sürekli girişi sucul ortamların kalitesini bozmakta ve sucul organizmalar için uygun olmayan yaşam ortamları oluşturmaktadır [3].

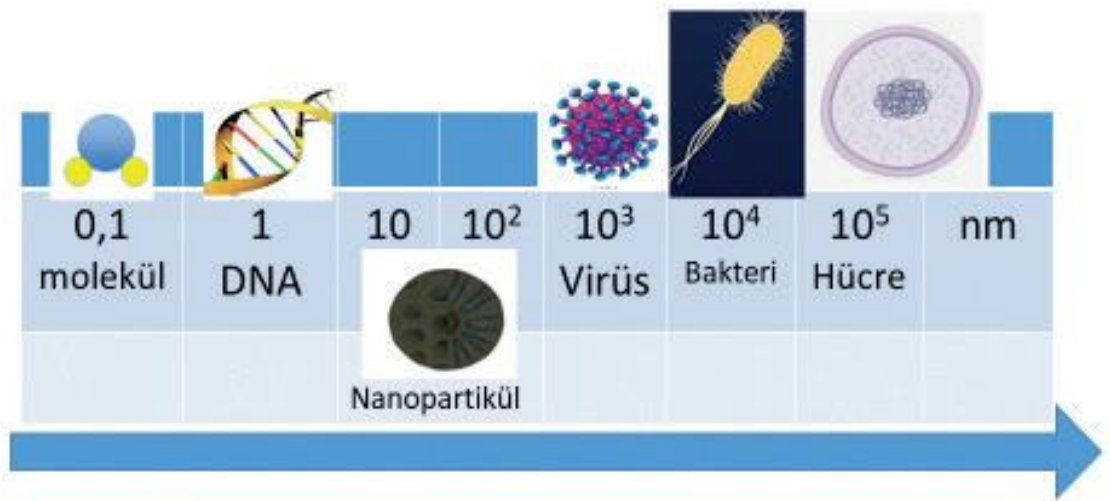
Cu, Cd, Pb, Zn ve özellikle de CuO gibi tehlikeli kirleticiler balıklarda zararlı etkilere neden olmaktadır [4]. Bununla birlikte aquatik hayvanların biyolojik sistemlerinde özellikle de homeostazisinin korunmasında kritik bir rol oynayan başlıca elementlerden biri bakırdır ve bu metalin konsantrasyonlarındaki değişimler bazı fizyolojik ya da biyokimyasal etkilere neden olabilmektedir [5]. Bakır balıklarda metallothionein sentezi, bazı organların histopatolojisi ve kan kimyası üzerine çeşitli fizyolojik etkilere sahiptir [6].

Bakır hemoglobin sentezi, kemik oluşumu gibi birçok metabolik fonksiyonlar için gerekli olup birçok enzimin de yapısal bileşenidir [7]. Bakır hücrel metabolizmada merkezi bir rol üstlenen sitokrom oksidazlar süperoksit dismutaz ve monooksijenazlar gibi farklı enzimlerde kofaktör olarak ve seruloplazminin de yapısında bulunarak canlı organizmalar için oldukça gerekli bir iz elementtir [8].

Doğal sularda bakır iyonlarının çoğu serbest değildir. Genellikle inorganik iyonlar ya da organik substanlarla birlikte bulunmaktadır. Bakır sülfat (CuSO_4) dünya genelinde balık üretim çiftliklerinde fitoplankton ve ipliksi alglerin büyümesini kontrol etmek ve birçok balık hastalıklarını önlemek için inorganik algisit olarak kullanılmaktadır. Bakır sülfatın 1-100 mg/L arasında değişen konsantrasyonları; balıklarda endoparazitlerin ya da ekzozantar ve bakterilerin neden olduğu hastalıkları kontrol etmek için önerilmektedir. Bununla birlikte fitoplankton kontrolü için kullanılan CuSO_4 konsantrasyonları nadiren balıklar için doğrudan toksik olurken

rotifer ve kopepodlar için öldürücü olabilmektedir [9]. Bakır içeren kirli sularda bu metalin konsantrasyonlarının 0.04 ile 294 $\mu\text{g/L}$ hatta bazen ekstrem durumlarda 20 mg/L 'ye de çıktığı belirlenmiştir [9]. Çevredeki bu yüksek Cu konsantrasyonları redoks reaksiyonlarındaki aktif rollerine bağlı olarak aquatik organizmalara toksik olabilmektedir. Cu'nun çözülebilir formları balıklar için oldukça toksiktir ve suda bulunan aşırı Cu çeşitli yollarla vücuda girerek dokularda birikim gösterebilmektedir [10].

Nanopartiküller 1 ve 100 nm arasındaki boyutlara sahip partiküller olarak tanımlanmakta ve küçük boyutlarına bağlı olarak yüksek yüzey alanına sahip olma gibi benzersiz özellikler göstermektedir [11]. Mühendislik nanomateriyallerin üretimi ve kullanımındaki artış, bunların su ortamlarına girmesi ve aquatik organizmalar üzerinde istenmeyen zararların oluşmasını da sağlamaktadır [12]. Nanopartiküllerin küçük boyutlarına, kimyasal kompozisyonlarına, yüzey yapılarına, çözünürlüklerine, şekillerine ve agregasyonlarına gibi eşsiz ve yararlı fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak çeşitli endüstrilerde kullanımları hızlı bir şekilde artmaktadır [13]. Nanopartiküllerin bu artan kullanımı ekosistemleri ve böylelikle de insan ve hayvan sağlığını da önemli ölçüde etkileyebilmektedir [14]. Nanopartiküllerin insan sağlığı ve doğal çevre üzerine etkilerini değerlendirmek ve risklerini ortaya çıkarmak günümüzde en önemli ekotoksikolojik araştırma konuları haline gelmiştir [16].



Şekil 1.1 Nanopartiküllerin boyut karşılaştırılması [17].

Nanopartiküller birkaç tipe ayrılmaktadır. Bunlardan doğal olanlar toprak, su ve volkanik tozlarda bulunmaktadır. Bu doğal nanopartiküller hem jeolojik hem de biyolojik süreçlerle oluşmaktadır. Bunlar toksik olsalar bile çoğu organizmalar bunlara karşı adaptasyon geliştirmişlerdir [18]. Son yıllarda nanopartiküller endüstriyel olarak da üretilmekte ve tarım, elektronik ürünler, tıp, eczacılık, kozmetik ve diğer birçok alanlarda kullanılmaktadır [19]. ABD ve Avrupa’da yapılan çalışmalarda entüstriyel atıklarda Ag-NP, TiO₂-NP, ZnO-NP gibi metal ve metaloksit nanopartikülleri belirlenmiştir [20]. Sonuç olarak nanopartiküller karasal ve sucul ortamlara girebilmekte canlı organizmalarda birikebilmekte ve fizikokimyasal etkilerine bağlı olarak zararlı etkiler ortaya çıkarmaktadırlar. Küçük boyutlarına bağlı olarak nanopartiküller hücre membranlarını geçebilmektedirler. Hücre içinde de çekirdek ve mitokondri gibi organellere ulaşabilmekte hücre metabolizmasında değişikliğe neden olmakta ve hatta hücreleri öldürecek süreçleri başlatabilmektedirler. Nanopartiküller kimyasal bileşimlerine ve fiziksel özelliklerine göre sitotoksik olabilmektedir. Örneğin nanopartiküllerin pozitif yüklü olanları membran lipid bariyerlerini parçalayabilmektedir. Nanopartiküller doğada yaşayan organizmalar üzerine doğrudan ya da dolaylı olarak zararlı etkiler oluşturabilmektedir. Günümüzde yapılan çalışmalarda bakteri, alg, memeli ve balık türlerinde toksik olduğu gösterilmiştir. Nanopartiküllerin bu toksik etkileri bu canlıların çoğunda üremeyi ve embriyonik gelişimi engellemekte, oksijen radikalleri aracılığıyla oksidatif strese neden olmakta, DNA kırıklarıyla genotoksisite göstermekte ve hücre ölümlerine neden olmaktadır. Ag-, ZnO- ve CuO-NP gibi nanopartiküller bakterisitler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak suya ya da diğer ortamlara karıştıklarında hedef olmayan organizmalarda da toksik etkiye neden olabilmektedir [21].

Nanoteknoloji uygulamaların çoğunda metalik nanopartiküller kullanılmaktadır ki bu da aquatik organizmalar için toksik olabilmektedir. ZnO, TiO₂ ve CuO gibi metal oksit nanopartikülleri ticari ve endüstriyel ürünlerde artan bir şekilde kullanılmaktadır [8]. Böylelikle kaçınılmaz olarak nanopartikül ürünler aquatik ortamlara girmektedirler. Nanopartikül toksisitesi ile ilgili çalışmalar hızla artmaktadır. CuO-NP’ler endüstriyel uygulamalarda, tüketici ürünlerinde, tıpta ve pestisitler olarak artan bir şekilde kullanılmaktadır [22]. CuO antimikrobiyal tekstil

ürünleri için de kullanılmaktadır [23]. Bakır nanopartikülleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak tekstil, ahşap koruma, biyoaktif kaplamalar, gaz ve sıvı filtrasyonlar, cilt ürünleri ve entegre devrelerde kaplama olarak en çok kullanılan nanopartikül materyallerden biridir [24].

Sucul ortama girdiklerinde metal nanopartikülleri bir araya toplanma, su içinde tortu oluşturma, besleyici özelliği olan maddelere adsorbe olma ya da çözülebilir metal iyonları şeklinde bulunabilmektedir [25]. Karasal organizmalar için nanopartiküllerin esas alınım yolları solunum ve sindirim iken aquatik organizmalarda solungaç yüzeylerini doğrudan geçme yoluyla da alınabilmektedir. Balıklarda iyon taşıyıcılarını kullanmak için çok geniş olduklarından nanopartiküllerin hedef hücrelere endositoz yoluyla girebildiği varsayılmaktadır [26].

Aquatik ortamlarda nanopartiküller birikme, toplanma ve sonra da sedimente katılma eğilimi gösterirler [27]. Bazı nehirlerde Cu-NP ve Ag-NP düzeylerinin sırasıyla 0.06 ve 0.04 mg/L olduğu rapor edilmiştir [28]. Nanopartikül toksisitesi tiplerine, şekillerine, büyüklüklerine ve yüzey alanları ile organizma içindeki bulunma sürelerine, metabolizma ve biyodağılımlarına bağlıdır. Balık karaciğerleri metal nanopartiküllerinin metabolizmasında ve birikiminde detoksifikasyonunda rol oynayan önemli bir organdır [29]. $\mu\text{g/L}$ seviyesinden düşük olan subletal bakır konsantrasyonları balıklarda bakır metabolizmasında merkezi bir rol oynayan karaciğerde birikim göstermektedir [30]. Solungaçlar sudaki bakır alınımında esas yoldur ve bu nedenle de bakır toksisitesinden en fazla etkilenen organlardan biridir [31].

Aquatik omurgasızlar ve balıklar, memelilere oranla herhangi bir toksik maddenin etkisine daha duyarlıdır bu nedenle düşük nanopartikül konsantrasyonu ile sucul organizmalar için endişe verici olabilir [32]. Yapılan çalışmalarda örneğin gümüş nanopartiküllerinin (1-10 nm) balıklarda metabolik aktiviteyi membran geçirgenliğini azaltarak oldukça sitotoksik ve yine Au-NP'lerin (5-10 nm) ROT üretimini oldukça artırarak toksik etkiye neden oldukları belirlenmiştir [33].

Bakırın patolojik etkileri ve hedef organ toksisitesi balıklarda iyi çalışılmıştır. Subletal Cu etkileşiminin kemikli balıklarda neden olduğu hematolojik, histopatolojik değişiklikler ve oksidatif stres gibi olumsuz etkileri rapor edilmiştir [34]. Bu nedenle

araştırmacılar hayvanlarda toksik kimyasalların etkileşimi ile oluşan toksikolojik etkileri arasındaki düzenli bir bağlantıyı tanımlamak için bazı biyolojik belirteçleri kullanmaktadırlar [11].

Bunlardan hematolojik parametreler kolaylıkla ölçülebilir ve aquatik organizmaların sağlık durumlarını değerlendirmek için yararlı belirteçler olarak kullanılabilir [35]. Gerçekten de hayvan kanını çalışmak kimyasal toksisitenin teşhisinde ve belirlenmesinde uygun bir yoldur [36]. Birçok araştırmacı bu nedenle çeşitli aquatik hayvanlardaki hematolojik parametreler üzerine bazı ağır metallerin etkilerini çalışmışlardır. Hematolojik parametreler, metal stresi altındaki balıkların fizyolojik durumlarının değerlendirilmesinde çok önemli parametreler olduğu vurgulanmaktadır. Eritrosit, hemoglobin ve hematokrit gibi hematolojik indisler kanın oksijen taşıma kapasitesinin fonksiyonel durumunu değerlendirmek ve sucul ortamlardaki ağır metal kirliliğinin indikatörleri olarak kullanılmaktadır. Balıklarda tam kan üzerine yapılan çalışmalarda metallerin hematopoetik organları etkileyerek lökositlerde değişikliklere ve ayrıca anemik durumların oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir [37,38].

Yine kan serum/plazmasındaki enzimatik veya nonenzimatik faktörler de düzenli olarak aquatik hayvanlardaki toksik materyallerin etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Enzim aktiviteleri üzerine tehlikeli kimyasalların etkisi stres tarafında kontrol edilen en önemli biyokimyasal faktörlerden biridir. Aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalin fosfataz (ALP) ve laktat dehidrojenaz (LDH) gibi bazı enzimler çoğu sucul organizmalarda kimyasal kirliliğin biyobelirteçleri olarak önerilmektedir [39]. AST ve ALT aktivitesindeki küçük bir değişim ağır metaller tarafından hasara uğratılan bazı mekanizmaların göstergesi olabileceği vurgulanmaktadır [40]. Keza ALP aktivitesi de farklı organizmalarda stres durumlarının tahmin edilmesinde bir biyomarker olarak kullanılmakta ve toksikolojide uygun diagnostik bir parametre olarak ifade edilmektedir. Balık serum ya da plazma kortizol ve glukoz düzeyleri de metalleri de içeren kirleticilerin olumsuz etkilerini değerlendirmekte kullanılmaktadır. Bu plazma metabolitleri özellikle de stres esnasında organizmanın gereksinim duyduğu enerjinin karşılanmasında işlevseldir.

Akuatik organizmalarda bakır iyonlarının toksik etkileri iyi bilinmekte ve bir redoks metal olarak Cu, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarına katılmakta ROT'ların oluşumunu ve oksidatif stresi indüklemektedir [41]. Oksidatif stres ROT oluşumundaki bir artışla ya da oksidatif hasarın giderilmesinde yetersizlik sonucu oluşabilen ve antioksidan savunma sistemlerinin etkinliklerini gösteren bir durumdur. Bakırı ROT oluşumunu ve üretimini arttırdığı ve oluşan bu ROT'ların da lipit peroksidasyon oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir [42]. Metallerin neden olduğu oksidatif strese karşı antioksidan savunma yanıtları oluşabilmektedir. Diğer metallerde olduğu gibi bakırın neden olduğu oksidatif hasara karşı da bu sistem indüklenebilmektedir.

Organizmalar doğal olarak da devamlı olarak oksidatif stresin etkisi altındadırlar ve aerobik organizmalar bu stresle baş etmek için süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimleri içeren enzimatik ve glutatyon (GSH) vitamin C ve E gibi serbest radikal temizleyicileri içeren enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahip olup bu savunma sistemi sayesinde oksidatif strese neden olan ROT'ları uzaklaştırmaktadırlar [43]. Enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar hücre hemoostazisinin korunmasında kritik bir rol oynar. Bu nedenle proksidan endojenler çevresel stres durumlarının varlığında biyolojik sistemlerdeki bu stresörlerin toksik etkilerini değerlendirmek için kullanılabilir [44].

ROT toksisitesine karşı hücreler SOD, CAT ve GPX'leri içermektedir. SOD süperoksit anyonunu hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen metalloenzim grubudur ve oluşan hidrojen peroksit CAT ve GPX ile detoksitiye edilir [45]. Katalaz hidrojen peroksiti moleküler oksijen ve suya dönüşümünü metabolize ederek uzaklaştıran ve hem grubu içeren enzimdir [45]. GPX, H₂O₂'nin suya metabolizmasını katalize eder ve GSH'ın GSSG dönüşümünü sağlar. GST hücrelerde özellikle de detoksifikasyon süreçlerinde temel bir rol oynayan enzimdir. GR de yine oksidatif strese karşı hücrelerin korumasında diğer enzimler kadar önemli bir rol oynamaktadır. Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH tiyol bakımından zengin bir tripeptid olup hücrelerin oksidatif stresle mücadelesinde ve detoksifikasyon süreçlerinde kritik öneme sahiptir. Oksidatif stresin neden olduğu hücresel hasarlardan biri de lipit

peroksidasyonudur. Hücre zarlarının kararlı yapısı ve yarı geçirgen özelliklerinin korunması hücrenin yaşamsal fonksiyonlarını yerine getirmesi için elzemdir. Birçok kirleticinin en önemli hücresel hedefi hücre zarlarıdır. MDA kimyasal toksikantların hücre zarlarında neden olduğu lipid peoksidasyonun bir göstergesi olarak ifade edilmektedir. Dokuların MDA düzeylerindeki artışlar oksidatif stresin de önemli bir belirteçidir.

Bakır tüm organizmalarda düşük düzeylerde oldukça gereklidir ve süperoksit dismutaz da olduğu gibi birçok enzimin aktivite göstermesinde de gerekli olmasına rağmen belli bir düzeyden sonra bu metal GSH düzeylerini azaltarak aquatik organizmalar üzerine tehlikeli bir etkiye neden olabilmektedir [46]. Bakırın ROT oluşumunu katalize ederek [42], GSH düzeylerini azaltarak [46] ve antioksidan enzimlerle etkileşime girerek oksidatif stresi indüklediği belirlenmiştir [8].

Balıklar sucul ekosistemlerin önemli bir organizma grubudur. Bu canlılar protein, vitamin ve mineral açısından zengin bir besin kaynağıdır. Dünyanın hemen her yerinde hem deniz hem de tatlı su balıkları, insanlar tarafından birinci dereceden besin kaynağı olarak tüketilmektedir. Toksikolojik araştırmalarda en çok kullanılan ve üzerinde en fazla değerlendirme yapılan balık türleri zebra balığı (*Danio rerio*), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), sazan (*Cyprinus carpio*) ve Nil tilapyasıdır (*Oreochromis niloticus*). *O. niloticus* tropikal bir tatlı su balığıdır ve ekonomik önemi nedeni ile yaygın bir şekilde kültürü yapılmaktadır. Ayrıca bu balıklar sıcaklık ve tuzluluk gibi değişen çevre koşullarına yüksek bir tolerans yeteneğine sahip olup kısa bir besin zincirine ve iyi bir besin değeri oranına sahiplerdir. Ayrıca yoğun stoklama durumlarına ve parazitik hastalıklara karşı da dirençlidirler [47].

Son yıllarda nanomateryal toksisitesi üzerine yapılan çalışmaların giderek artmasına rağmen nanopartiküllerin hücresel düzeylerden ekosistem düzeyine kadarki etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulmuş değildir. Nanomateryallerin potansiyel yararlarındaki artışa rağmen karasal ya da sucul ekosistemlere girişim yapmalarından dolayı potansiyel toksik etkilerinin de dikkatli izlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu alanda yeni araştırmalara acilen gereksinim vardır [48]. Nanotoksosite ile ilgili çoğu çalışmada bu partiküllerin atmosferik ve solunum etkileşimleri üzerinde durulmuştur.

Bununla birlikte nanopartüller su ortamlarına da ulaştıklarından aquatik sistemlerde de risk oluşturmaktadırlar [49]. Bu nedenle sucul organizmalar üzerine bu kirleticilerin etkilerini çalışmak önemlidir.

Balıklardaki nanometal toksikolojik araştırmaların çoğunda; bu metallerin alınımı, taşınması, birikimi ve detoksifikasyonunda işlevsel olan hedef dokular olarak da dikkate alınan kan, solungaç ve karaciğeri dokuları üzerine yoğunlaşmıştır [31,34,37]. Balıklar bakır nanopartiküllerine karşı savunmasızdır; çünkü bu nanopartiküller solungaç hasarına ve ölüme bile neden olabilirler. Bakır nanopartiküllerin toksisiteleri; kimyasal bileşime, etkileşim dozuna ve etkileşim yolları ile büyüklük ve yüzey boyutu, çözünme ya da agregasyon özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir [50]. Bakıroksit gibi metal oksit nanopartiküllerin balıklar üzerine toksik etkilerini açığa çıkarmak, kirleticilerin hedef olmayan aquatik organizmalardaki toksisitelerinin belirlenmesi için önemlidir.

Sunulan bu çalışmada insanların önemli bir besin kaynağı olan tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'un hematolojik, plazma biyokimyasal ve oksidatif stres paramtereleri üzerine CuSO₄ ve CuO-Np'nin karşılaştırılmalı etkilerinin ortaya çıkartılması amaçlanmaktadır. Genelde balıklar üzerine nanopartiküllerin etkileri ilgili fazla bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle sunulan çalışmada balıklar bakırın hem metal hem de nanopartiküler formunun etkisine bırakılacak ve bu balıkların eritrosit, lökosit, hematokrit, hemoglobin, plazma ALT, AST, ALP, kortisol, glukoz ile karaciğer ve solungaç dokuları CAT, SOD, GPX, GR, GST, GSH ve MDA parametreleri analiz edilecek ve elde edilen veriler değerlendirilecektir. Bu çalışma ile toksisite karşısında balıklarda meydana gelen savunma mekanizmalarının, nanopartiküler maddelerin etkilerinin ve toksisite fazında biyokimyasal mekanizmaların durumlarının daha iyi anlaşılabilmesi sağlanacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gomes ve ark. [51], bir Oligochaeta olan *Enchytraeus albidus*'ta Cu-NP ile CuCl₂'nin karşılaştırmalı etkilerini stres biyomarkırlarını kullanarak araştırmışlardır. Araştırmalarında lipid peroksidasyon, GSH, GSSG, SOD, CAT, GPX, GR, GST gibi oksidatif stres parametrelerini incelemişlerdir. Hem Cu-NP'nin CuCl₂'nin oksidatif strese ve hasarlara neden olduğu belirlenmiştir.

Govindasamy ve Rahuman [52], 25, 50 ve 75 mg/L Ag-NP etkisine 8 gün süre ile bıraktıkları *O. mossambicus*'un solungaç, karaciğer dokularındaki SOD, CAT ve peroksidaz enzim aktiviteleri ile MDA düzeylerindeki değişimleri inceledikleri çalışmalarında karaciğer ve solungaç dokusu SOD ve CAT aktivitesinin genel olarak arttığı bu dokuların MDA düzeylerinde de artışların olduğu belirlenmiştir.

Hau ve Chen [53], 1, 3, 7, 14 gün sürelerle 0.5, 5.0 ve 50 mg/L ZnO-NP'nin etkisine bırakılan *Cyprinus carpio*'nun solungaç, karaciğer, beyin ve bağırsak dokularındaki SOD, CAT ve GPX aktiviteleri ile GSH ve Lipid peroksidasyon düzeylerini araştırmışlardır. Nanopartikülün dozuna ve süreye bağlı olarak incelenen oksidatif stres parametrelerinde anlamlı değişimler belirlenmiştir. Özellikle de 50 mg/L ZnO-NP antioksidan enzim aktivitelerinde artış, GSH düzeylerinde ise azalışlara neden olmuştur. Araştırmacılar bu biyooksidatif stres belirteçlerinin balıklarda nanopartiküllerin toksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Solungaç, karaciğer ve beyin ZnO-NP etkisine en hassas organlar olduğu belirlenmiştir.

Shaw ve ark. [34], *Oncorhynchus mykiss*'te doku iz element düzeyleri, hematoloji ve biyokimyasal parametreler üzerine 4 ve 10 gün süre ile 20 ve 100 µg/L CuSO₄ ve Cu-NP'nin etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar solungaç dokusundaki lipid peroksidasyonun bir göstergesi olan TBARS miktarlarının Cu etkisinde arttığını bu artışların CuSO₄'e oranla Cu-NP'lerde daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yine araştırmada Cu-NP'lerin genel olarak CuSO₄'e benzer toksik etkiler gösterdiği vurgulanmıştır.

Al-Bairuty ve ark. [31], 4 ve 10 gün sürelerle 20 ve 100 µg/L CuSO₄ ve Cu-NP etkisine bıraktıkları *O. mykiss*'in dokularındaki histopatolojik değişimleri

incelemişlerdir. Cu formlarının etkisinde karaciğer, solungaç böbrek ve beyin gibi dokularda önemli patolojik değişimler meydana gelmiştir. Genel olarak CuSO₄ ve Cu-NP benzer patolojik durumlara neden olmuştur. Cu-NP'nin karaciğer, beyin ve bağırsakta, CuSO₄'ün ise solungaç ve kaslarda daha fazla patolojik durumlara neden olduğu belirtilmiştir.

Chen ve ark. [54], *Carassius auratus*'un kan hücreleri üzerine Cu₂O-NP'nin etkilerini inceledikleri çalışmalarında 40 µg/ml Cu₂O-NP dozlarının kan hücrelerine toksik olduğu ve eritrosit membranlarında ciddi hasarlara neden olduğu belirlenmiştir.

Fernandes ve ark. [32], *in-vitro* olarak ZnO ve Zn-NP'nin etkisine bırakılan balık hücrelerindeki hücresel yanıtları değerlendirdikleri çalışmalarında ZnO-NP'nin sitotoksik etkisinin ZnO'ya göre daha fazla olduğunu, ZnO-NP'nin doza bağlı olarak oksidatif stresi indüklediğini ve GST aktivitesi ROT ile total-GSH düzeylerinin oksidatif stresin belirteci olarak kullanılabileceği belirlenmiştir. ZnO-NP, ROT oluşumunu ve GST aktivitesi ile total-GSH düzeylerini artırmıştır.

Isani ve ark. [8], *O. mykiss*'te CuO-NP ile CuSO₄'ün karşılaştırmalı toksisitelerini araştırdıkları çalışmalarında, bakırın balık plazma karaciğer ve solungaç dokularında biriktiğini, bakır birikiminin genel olarak CuSO₄ etkileşiminde daha fazla olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca DNA hasarlarının da CuSO₄ grubunda daha fazla olduğu belirlemiştir.

Vignesh ve ark. [55], Ag-NP'nin *Labeo rohita*'daki hemotolojik ve biyokimyasal etkilerini inceledikleri çalışmalarında hemoglobin ve total kan hücre sayısının arttığını, karaciğer, solungaç ve böbrek GOT ve GPT aktivitelerinin ise azaldığını belirlenmiştir.

Abdel – Khalek ve ark. [56], 7, 14, 28 günlük sürelerle Zn ve Zn-NP'nin 96 saatlik LC₅₀ değerinin 1/2'sine bırakılan *O. niloticus*'ta biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri incelemişlerdir. Her iki Zn formu da serum glukoz düzeylerinde ve karaciğer enzimleri olan AST, ALT, ALP aktivitelerinde artışlara neden olmuştur. Zn-NP karaciğer ve solungaç GPX, CAT, SOD aktivitesi ile MDA düzeylerinde artışlara, GSH düzeylerinde ise azalışlara neden olmuştur. Araştırmada Zn-NP'lerin Zn'ye oranla daha fazla toksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Abdel-Khalek ve ark. [57], CuO ve CuO-NP'nin etkisine bırakılan *O. niloticus*'un serum biyokimyası ile doku oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Serum glukoz ile AST, ALT ve ALP enzim aktivitelerinde her iki Cu formu etkisinde artış gözlenmiştir. Hem CuO ve hem de CuO-NP'nin karaciğer ve solungaç dokuları GSH düzeylerini azalttığı bununla birlikte MDA düzeyi ile GPX aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Solungaç CAT ve SOD aktivitesi her iki CuO formunda artış göstermiştir. Bununla birlikte karaciğerde bu enzimler CuO-NP etkisinde azalış göstermiştir.

Khabbazi ve ark. [58], 1, 5, 20, 100 ppm CuO-NP etkisine 4 gün süreyle bırakılan *O. mykiss*'te bazı hematolojik parametrelerdeki değişimleri araştırmışlardır. Araştırmada hematolojik parametrelerden lökosit, özinofil, nötrofil ve hematokritin CuO-NP'den etkilendiği hemoglobin ve monositlerin etkilenmediği belirlenmiştir. Çalışmada 96 saatlik süre sonunda balıklarda ölüm gözlenmemiştir.

Wang ve ark. [59], *Epinephelus coioides*'in büyüme parametreleri, sindirim enzimleri, vücut kompozisyonu ve histolojisi üzerine CuSO₄ ve Cu-NP'nin etkilerini inceledikleri çalışmalarında balıklar 25 gün süre ile 20 ile 100 µg/L Cu formlarının etkisine bırakılmıştır. İncelenen parametrelerde her iki Cu formu etkisinde önemli değişiklikler meydana geldiği ve Cu-NP'nin CuSO₄'e benzer toksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir.

Wang ve ark. [60], *E. coioides*'in bağırsak dokusu oksidatif stres, apoptoz ve immün sistemler üzerine Cu-NP ve CuSO₄'ün karşılaştırmalı etkilerini incelemişlerdir. Balıklar 25 gün süreyle her iki bakır formunun 20 ve 100 µg/L etkisine bırakılmıştır. Etkileşim süresi sonunda ve doza bağlı olarak hem Cu-NP hem CuSO₄'ün etkisinde bağırsak MDA düzeylerinde artışlar total-SOD ve CAT aktivitesiyle GSH düzeylerinde azalışlar belirlenmiştir. Cu-NP ve CuSO₄'e genel benzer toksik etkiler göstermesine rağmen Cu-NP'nin toksitesinin CuSO₄'e göre biraz daha şiddetli olduğu rapor edilmiştir.

Abdel – Khalek ve ark. [61], CuO ve CuO-NP'nin LC₅₀ değerlerinin 1/10 ve 1/20'sine 30 gün süreyle bırakılan *O. niloticus*'un hematolojik ve histolojik biyomarkırlarındaki değişimleri incelenmiştir. Her iki bakır formu da eritrosit sayısı, hemoglobin ve hemotokrit düzeylerinde azalışlara neden olmuştur. Yine hem CuO ve

hem de CuO-NP'nin etkisinde karaciğer solungaç ve böbrek dokularında önemli histopatolojik değişimler belirlenmiştir.

Ateş ve ark. [62], *O. niloticus*'ta demir oksit nanopartiküllerinin metal birikimi, atılımı, hematolojisi ve immün yanıtlar üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında hemoglobin, hematokrit, eritrosit ve lökosit düzeylerinde önemli değişimlerin olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmada demir oksit nanopartiküllerinin etkisinde serum glukoz düzeylerinde azalışların, serum ALT, AST ve LDH aktivitelerinde artışların meydana geldiği gözlenmiştir.

Benavides ve ark. [48], Al₂O₃- ve ZnO-NP'nin tek başına ve birlikte etkilerinde tatlı su balığı *C. auratus*'un solungaç ve karaciğer dokusundaki CAT, GST ve SOD aktivitesi ile lipid peroksidasyon ve doku patolojisindeki değişimleri araştırmışlardır. 14 günlük süre sonunda metal oksit nanopartiküllerinin tek başına ve birlikte etkisinde karaciğer ve solungaç CAT ve SOD aktivitesinde artış, 21 günlük süre sonunda ise azalış belirlenmiştir. Yine solungaç GST aktivitesi 7 günün sonunda artış gösterirken karaciğerde 14 günün sonunda artış belirlenmiştir. Solungaç ve karaciğer MDA düzeyleri ise 14 günün sonunda anlamlı bir artış göstermiştir.

Gupta ve ark. [63], 20 ve 100 µg/L Cu-NP etkisine 7 gün süreyle bırakılan *C. carpio*'daki biyokimyasal ve histolojik parametrelerdeki değişimleri belirlemişlerdir. Araştırmacılar Cu-NP'nin balıkların solungaç, karaciğer ve böbrek dokularındaki oksidatif stres parametreleri olan CAT, SOD ve GST aktivitelerinde artışlara neden olduğunu belirlemişlerdir. Yine araştırmacılar Cu-NP'nin kısa dönemli etkilerinin balıklarda oksidatif strese ve balıkların büyüme ve gelişimlerin de rol oynayan dokularda ciddi hasarlara neden olduğunu da rapor etmişlerdir.

Alkobaby ve El-Wahed [9], 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/L CuSO₄ etkisine bıraktıkları *O. niloticus*'ta bakırın karaciğer ve solungaç dokusu üzerine histopatolojik etkilerini araştırmışlardır. CuSO₄ için 96 saat LC₅₀ değeri 31,2 mg/L bulunmuştur. CuSO₄'ün artan dozuna bağlı olarak hem solungaç hem de karaciğerde önemli patolojik değişimler belirlenmiştir.

Tunçsoy ve ark. [64], *O. niloticus*'un solungaç karaciğer ve kas dokularında CuO-NP etkileşiminini takiben bakır birikimini ve SOD, CAT, GPX aktivitelerindeki değişimleri incelemişlerdir. Balıklar 15 gün süre ile 20 µg/L CuO-NP etkisine

bırakıldıklarında etkileşim süresi boyunca balıklarda ölüm gözlenmemiştir. Solungaç ve karaciğer dokusunda bakır birikimi artmıştır. Ayrıca CuO-NP solungaç ve karaciğer dokusunda SOD ve CAT aktivitesini azaltırken GPX aktivitesini ise artırmıştır.

Akbary ve ark. [65], 21 gün süreyle 0.79 ve 1.57 mg/L CuO etkisine bıraktıkları *Mugil cephalus*'ta hepatik enzim aktivitesi ve oksidatif stres ile hematolojik parametrelerdeki yanıtları incelemiştir. CuO bu balıkların hemoglobin, eritrosit ve hematokrit düzeylerini düşürürken lökositlerde artışa neden olmuştur. Yine CuO etkisinde plazma AST, ALT ve LDH aktivitesinde artış, ALP aktivitesinde ise azalış belirlenmiştir. Karaciğer SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH düzeylerinde CuO etkisindeki balıklarda önemli azalışlar gözlemlenmiştir. Araştırmacılar hematolojik ve hepatik antioksidanlarının ağır metal toksisitesinin değerlendirilmesinde biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ostaszewska ve ark. [66], 28 gün süre ile Ag-NP ve Cu-NP etkisine bıraktıkları *O. mykiss*'in karaciğerlerinde sitotoksik etkilerin meydana geldiğini Ag-NP'ye oranla Cu-NP'nin daha fazla doku hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Wang ve ark. [24], 30 gün süreyle 20 ve 100 µg/L Cu-NP etkisine bırakılan ekonomik olarak önemli bir tür olan *Takifugu fasciatus*'un karaciğerindeki oksidatif stres, hücre apoptozu ve immün yanıtları araştırmışlardır. Karaciğer oksidatif stres parametrelerinde (MDA, total-SOD, CAT ve GSH), apoptoz indeksi ve kaspaz enzim aktivitelerinde Cu-NP etkisinde artış belirlenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM**3.1. Materyal**

Araştırma için gerekli Etik Kurul onayı Çukurova Üniversitesi (ÇÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınmıştır (Karar No:2, Tarih: 26.02.2018, EK-1). Çalışmamızda araştırma materyali olarak *Oreochromis niloticus* kullanılmıştır. Balıklar, ÇÜ Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki balık yetiştirme havuzlarından alınmış ve yine aynı ünivesitenin Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Ekofizyoloji laboratuvarına getirilerek cam akvaryumda ortam koşullarına uyumları için iki ay süre ile bırakılmışlardır. Bu sürede deneyde kullanılacak balıklar 14.33 ± 0.28 cm boy ve 52.71 ± 0.63 g ağırlığa ulaşmıştır.

Deneyler 25 ± 1 °C’de yürütülmüş, günde sekiz saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Merkezi havalandırma sistemiyle akvaryumların havalandırılması sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarına uyumları sırasında balıklar, hazır balık yemi kullanılarak (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Denemelerden 48 saat öncesinde yem kesilmiş ve denemeler boyunca günde iki defa olmak üzere vücut ağırlıklarının %2’si kadar yem ile balıklar beslenmiştir. Deney suyunun fizikokimyasal özellikleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Deney ortam suyunun fizikokimyasal özellikleri

Su sıcaklığı	22.18 ± 0.42 °C
Çözünmüş oksijen	7.65 ± 0.37 mg/L
pH	7.98 ± 0.06
Toplam sertlik	318 ± 3.5 mg/L CaCO ₃

3.2. Yöntem

Deneylerde bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, SIGMA) ve bakır oksit nanopartikülü (CuO-NP , <50 nm, SIGMA) kullanılmıştır. Deneyler her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan 3 adet cam akvaryumda yürütülmüştür. Balıklar, CuSO_4 ve CuO-NP 'in 0.05 mg/L derişimlerinin etkisine 4 ve 21 gün süreler boyunca bırakılmıştır.

Deneylerde 3 akvaryumun ilk ikisine 120 L 0.05 mg/L CuSO_4 ve CuO-NP çözeltileri; üçüncü akvaryum ise kontrol grubu olarak kullanılarak içerisinde aynı hacimde (120 L) ve bakır içermeyen dinlendirilmiş çeşme suyu konmuştur. Deney akvaryumlarında kullanılan bakır çözeltilerinin derişimlerinde zamana bağlı olarak değişim olabileceği dikkate alınarak çözeltiler her gün yeni hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir.

3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ve Biyokimyasal Analizler

Denenen etki süreleri sonunda deney akvaryumlarından rastgele balıklar alınmıştır. Balıkların kan alma sırasında strese girmesini ve böylelikle incelenecek kan parametrelerinde meydana gelebilecek olası değişiklikleri önlemek için balıklara anestezik madde uygulanmıştır. Akvaryumlardan alınan balıklar 75 mg/L derişimindeki MS222 (etil p-amino benzoat metan sülfanat veya trikain metan sülfanat) anestezik maddesi ile bayıltılmıştır. Bayıltılan balıkların boy ve ağırlıkları alındıktan sonra zaman kaybetmeksizin kaudal pedinkülün vertikal kesilmesi yoluyla kan örnekleri temin edilmiştir. Kan örnekleri içinde antikuagülant madde bulunan (EDTA'lı) tüplere alınmıştır. Alınan kan örneklerinin bir kısmı hematolojik bir kısmı ise plazma biyokimyasal parametrelerin analizi için kullanılmıştır.

Kan örneklerinin eritosit ve lökosit sayıları ile hemoglobin ve hematokrit düzeyleri, ÇÜ Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında Beckman Coulter LH 750 Analyser cihazında belirlenmiştir. EDTA'lı tüplerdeki kan örneklerinin kalan kısmı ise 10 dakika süre ile 3000 rpm'de santrifüj edilerek ALT, AST, ALP, kortizol ve glukoz, düzeylerinin belirlenmesinde kullanılacak plazma örnekleri elde edilmiştir. Alınan plazma örnekleri eppendorf tüplere aktarılarak analize

hazır hale getirilmiştir. Plazma örneklerindeki biyokimyasal parametrelerin analizi, ÇÜ Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarındaki otoanalizator cihazlarında (Beckman Coulter DXC 800 ve Beckman Coulter DXI 800) yürütülmüştür.

3.2.2. Doku Örneklerinin Alınması ve Biyokimyasal Analizler

Belirlenen her sürenin sonunda kan örnekleri alınan her bir balık hemen diseksiyon aşamasına alınmıştır. Steril aletlerle solungaç ve karaciğer örnekleri buz üzerinde disekte edilmiş, bu örnekler % 0.59 NaCl ile yıkanmış ve ağırlıkları alındıktan sonra biyokimyasal analize kadar -80 °C’de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.2.1. Homojenatların Hazırlanması

Disekte edilen dokular 1/10 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde 0.25 M sükroz içeren 0.05 M soğutulmuş Na-P tamponu (pH: 7.4) ile buz içerisinde ultra-turrax homojenizatörde 3 dakika süreyle 10.000 rpm’de homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4 °C’de 10.000 rpm’de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda CAT, SOD, GR, GST ve GPX aktiviteleri ile GSH, MDA ve protein düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir.

3.2.2.2. CAT Aktivite Tayini

Prensip: Katalaz aktivite tayini, H₂O₂’nin 240 nm dalga boyundaki absorbansının enzim ile etkileşiminden sonra zamana bağlı olarak azalması dikkate alınarak yapılmıştır [67].

Ayırıcılar:

- a. 50 mM Fosfat Tamponu (pH 6.8): 2.482 g K₂HPO₄ ve 4.864 g KH₂PO₄ alınır ve pH ayarlandıktan sonra saf su ile 1000 mL’ye tamamlanır.

- b. 10 mM H₂O₂: %30'luk peroksitten 10 µL alınır ve 9990 µL saf suyla tamamlanır.
- c. 1 M HCl: %37'lik HCl'den 43 µL alınır ve fosfat tamponuyla 50 mL'ye tamamlanır.

Yöntem: 50 mmol/L fosfat tamponu (pH 6.8) içerisinde 10 mmol/L H₂O₂ olacak biçimde substrat çözeltisi hazırlanmıştır. 20 µL örnek üzerine 2.5 ml substrat çözeltisi eklenerek 37 °C sıcaklıkta iki dakika bekletilmiş ve tepkimeyi durdurmak için üzerine 0.5 ml 1 M HCl çözeltisi eklenerek 240 nm dalga boyundaki absorbansı (Ar) ölçülmüştür.

Kör için 2.5 ml 50 mmol/L fosfat tamponu (pH 6.8) ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözelti kullanılmıştır.

H₂O₂'in başlangıç absorbans (As) değerini saptamak için 2.5 ml substrat ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.

Proteinin neden olduğu absorbansı (At) tespit etmek için 20 µL örnek, 2.5 ml fosfat tamponu ve 0.5 ml 1 M HCl içeren çözeltinin absorbansı ölçülmüştür.

Hesaplama:

Enzimatik aktivite kaynaklı absorbans (A) değişimi:

$$A = (A_s + A_t) - A_r$$

Enzim aktivitesi hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{CAT aktivitesi (U/mL)} = \frac{A \cdot V_t}{\epsilon \cdot t \cdot V_0}$$

V_t = Toplam reaksiyon hacmi (mL)

V₀ = Örnek hacmi (mL)

ε = H₂O₂'nin molar ekstinksiyon katsayısı (0.0396 cm²/µmol)

t = Reaksiyon zamanı (dakika)

$$\text{CAT Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{CAT Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.2.3. SOD Aktivite Tayini

Prensip: Enzim aktivite tayini, ksantin ve ksantin oksidazın reaksiyonuyla oluşan süperoksit anyon radikallerinin, nitrobluetetrazolium ile oluşturduğu mavi renkli formazan boyasının 560 nm'deki absorbansının okunması esasına dayanmaktadır [68].

Ayırıcılar:**1. Reaktif:**

- 0.3 mM Ksantin:** 9.13mg alınıp 200 mL saf suda çözülmüştür.
- 0.6 mM EDTA:** 22.3 mg alınıp 100 ml saf suda çözülmüştür.
- 150 µg/L N.B.T.:** 12.3 mg alınıp 100 mL saf suda çözülmüştür.
- 400 mM Na₂CO₃:** 2.544 g alınıp 60 mL saf suda çözülmüştür.
- 1g/L Sığır serum:** 30 mg alınıp 30 mL saf suda çözülmüştür.

2. Ksantin Oksidaz (167 U/L): 18 µl alınıp 3 ml 2 M (NH₄)₂SO₄ da çözülmüştür.

3. CuCl₂.2H₂O (0.8 mM): 13.6 mg alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

Yöntem: Enzim aktivite tayini için iki tüp alınmış ve Çizelge 3.2'te belirtilen ayırıcılar konmuştur.

Çizelge 3.2 Süperoksit Dismutaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör	Numune
Reaktif	2.85 ml	2.85 ml
Numune	-	0.1 ml
Ksantin oksidaz	50 µL	50 µL
25 °C'de oda sıcaklığında 20 dakika bekletilip		
CuCl ₂	0.1 ml	0.1 ml
Numune	0.1 ml	-

560 nm dalga boyunda absorbans değerleri distile suya karşı okunmuştur.

Hesaplama:

$$\text{SOD Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{KörOD} - \text{NumOD}}{\text{KörOD}} \times 20$$

20: zaman (dakika)

$$\text{SOD Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.2.4. GPX Aktivite Tayini

Prensip: Glutasyon peroksidaz, GSH'ın H₂O₂ ile GSSG'ye yükseltgenmesini katalizler. T-butil hidroperoksit varlığında GPX'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH'ın NAD⁺'ye yükseltgenmesi esnasındaki absorbans farkının 37 °C 340 nm'de okunması ile belirlenir [69].

Ayırıklar:**1- 1 M Tris Tamponu (pH=8.0)**

Tris HCl 8.80 g

Tris Baz 5.40 g

EDTA 0.14 g

100 mL saf suda çözülür.

2 -0.1 M GSH:

0.0155 g GSH alınır ve 0.5 mL saf su eklenir.

3- 10 U/mL GR:

50µL GR alınır ve 2450 mL saf su eklenir.

4- 2mM NADPH:

0,0045 g NADPH tartılır ve 2500 ml saf su eklenir.

5- 7 mM t butil Hidroperoksit:

5 µL t butil hidroperoksit alınıp 5 mL saf su eklenir.

Yöntem: GPX aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.3'te belirtilen ayırıklar konmuştur.

Çizelge 3.3 Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Saf Su	+	660
Tris Tamponu	-	100
GSH	-	20
GR	-	100
NADPH	-	100
Örnek	-	10
37 °C’de 10 dakika inkübe edilir		
t- butil	-	10
hidroperoksit		

Kör için saf su kullanılmış ve tepkimeler ise 37°C’de 1 cm ışık yollu kuvarz küvetlerde 340 nm’de 0. , ve 5.’ absorbans değeri ile izlenmiştir.

Hesaplama:

$$\text{GPX Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_ö}$$

ΔOD = Zamana bağlı absorbans farkı

V_t = Toplam hacim

t= Zaman

$V_ö$ = Örnek hacim

6.22= 1 cm’lik ışık yolunda 1 nmol NADPH’in verdiği absorbans değeri

$$\text{GPX Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPX Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.2.5. GST Aktivite Tayini

Prensip: Enzim aktivite tayini, CDNB’nin redükte glutatyon ile konjugasyonu esnasındaki absorbans değişiminin 340 nm’de okunması esasına dayanır [70].

Ayıracılar:**1-100 mM Tris Tamponu (pH=7.4)**

Tris HCl 3.2846 g

Tris Baz 0.5036 g

250 mL saf suda çözülür.

2- 20 mM CDNB (%95'lik 10 mL alkolde çözülür.)

0.0405 g CDNB tartılır üzerine 9.52 mL mutlak alkol konur.0.44 mL su eklenir.

3-Redükte Glutasyon (taze hazırlanır)

0.0030 g GSH alınır üzerine 10 mL tris tamponu eklenir.

Yöntem: GST aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.4'te gösterilen çözeltiler konmuştur.

Çizelge 3.4 Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

25°C'de 340 nm'de 0. ve 2. dakikalarda okunur.

Hesaplama:

$$\text{GST Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{0.0096 \times V \times \bar{v}}$$

 ΔOD = Zamana bağlı absorbans farkı V_t = Toplam hacim

t: zaman

V_{δ} = Örnek hacim

0,0096= 1cm'lik ışık yolunda 1 mM CDNB'nin verdiği absorbands değeri

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi (U /mg protein)} = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.2.6. GR Aktivite Tayini

Prensip: GR aktivitesi, NADPH'İN NADP⁺'a yükseltgenmesi esnasındaki absorbands değişiminin 340 nm'de okunmasına göre belirlenir [71].

Ayırıklar:

1-100m μ Na-P Tamponu: (pH=8.0)

Na₂HPO₄.7H₂O 5.7554 g

NaH₂PO₄.2H₂O 0.5328 g

Saf su ile 250 ml'ye tamamlanır.

2-Günlük Tampon

1mM GSSG ve 0.12 mM NADPH'in tampon içinde çözülmesiyle hazırlanır.

0.0165 g GSSG + 0.002 g NADPH 27 mL 100 mM Na-P içinde çözülür.

Yöntem: GR aktivitesi için iki küvet alınmış ve çizelge 3.5'te gösterilen ayırıklar konmuştur.

Çizelge 3.5 Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (μ L)	Örnek (μ L)
Saf su	100	-
Günlük tampon	900	900
Örnek	-	100

Çalkalanır ve 37 °C'de 340 nm'de 0. ve 5. dk. köre karşı absorbands değerleri ölçülür.

Hesaplama:

$$\text{GR Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_0}$$

ΔOD =Zamana bağlı absorbans farkı

t= Zaman

V_t = Toplam hacim

V_0 =Örnek hacmi

6,22= 1 cm'lik ışık yolunda 1nmol NADPH'ın verdiği absorbans değeri

$$\text{GR Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GR Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.2.2.7. GSH Düzeyi Tayini

Prensip: DTNB, sülfidril bileşikleri tarafından redükte edilen bir disülfit bileşiği olup sarı renkli bir anyon oluşturmaktadır. Örnek ile DTNB'nin oluşturduğu sarı renkli kompleksin renk şiddeti ortamdaki GSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 412 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir [69].

Ayırıcılar:**1. Çöktürücü çözelti**

Galsiyel metafosforik asit 1.67 g

Disodyum EDTA 0.20 g

NaCl 30.0 g

Distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

2. 0.3 M Na₂HPO₄

Na₂HPO₄ 42.59 g

Distile su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3. %0.02 DTNB çözeltisi

DTNB 20 mg

%1'lik sodyum sitrat ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Yöntem: 200 µL homojenat üzerine 2 mL saf su ilave edilir. GSH tayini için iki tüp alınır ve çizelge 3.6'da belirtilen ayıraçlar konur.

Çizelge 3.6 Redükte Glutasyon Yöntemi

Çözeltiler	Kör (mL)	Örnek (mL)
Homojenat	-	2
Distile su	2	-
Çöktürücü	3	3

5 dakika bekletilmiş, örnek filtre kağıdından süzölmüş;

Süzüntü	2	2
0.3 M Na ₂ HPO ₄	8	8

412 nm'de köre karşı okunmuş (OD₁), tüplere;

%0.02 DTNB	1	1
------------	---	---

İlave edilip 412 nm'de köre karşı okunmuştur (OD₂).**Hesaplama:**

GSH miktarı µmol/g protein olarak hesaplanır.

$$\frac{C}{1000} = \frac{(OD_2 - OD_1)}{13600} \times \frac{11}{2} \times \frac{5}{2} \times \frac{100}{Pro}$$

$$C (\mu\text{mol/g Pro}) = \frac{(OD_2 - OD_1) \times 101}{Pro (g/dL)}$$

13600: GSH ve DTNB etkileşimi sırasında oluşan sarı rengin molar ekstinksiyon katsayısı.

Pro: Protein (g/dL)

1000: μmol 'e dönüşüm katsayısı

C: μmol glutasyon

OD₁: DTNB ilave edilmeden önceki 412 nm'de ölçülen optik dansite

OD₂: DTNB ilave edildikten sonraki 412 nm'de ölçülen optik dansite

11/2 ve 5/2: Sulandırma katsayısı.

3.2.2.8. MDA Düzeyi Tayini

Prensip: Malondialdehid 90 °C sıcaklıkta thio barbutirik asit ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu kompleks spektrofotometrede 535 nm'de ölçülmektedir [72].

Ayırıcılar:

TBA (%0.8): 0.8 g TBA tartılır ve 100 ml distile suda çözülür.

TCA (%20): 20 g TCA 100 ml distile suda eritilir.

Stok Standart: 1,1,3,3 Tetrametoksipropan.

Yöntem:

MDA aktivitesi tayini için süpernatanttan alınan 250 μl örnek, 125 μl %20 TCA ile karıştırılır. Bu karışım 15000 g de, 10 dakika süreyle +4 °C'de santrifüj edilir. Tüpteki süpernatant (300 μl), 200 μl TBA ile karıştırılır ve 60 dakika süreyle sıcak su banyosunda (90 °C) bekletilir. Bu işlem sonunda 535 nm de spektrofotometrede okuma yapılır.

Hesaplama:

Sonuçlar standart eğride değerlendirilir. Standart olarak 1,1,3,3 Tetrametoksipropan kullanılacaktır. Stok standarttan 6.6 μl alınır ve distile suyla 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltilen 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanır ve örneklere yapılan işlemin aynısı yapılarak standart eğri çizimi gerçekleştirilir. Bu eğriden yararlanılarak MDA miktarı hesaplanır. MDA miktarı

belirlenip, protein miktarına bölünüp, sonuçlar nmol MDA/mg protein cinsinden bulunur.

3.2.2.9. Protein Düzeyi Tayini

Prensip: Proteinler, alkali ortamda bakır sülfat eklenmesiyle fosfotungustik-fosfomolibdik asidi redükleyerek mavi renk oluştururlar. Bu renkli bileşiğin absorbands değeri 750 nm’de ölçülerek protein miktarları tespit edilir [73].

Ayıraçlar:

1. Çözelti A:

Na₂CO₃ 10 g

NaOH 2 g

alınır ve 500 mL’ye saf su ile tamamlanır

2. Çözelti B:

CuSO₄.5H₂O 0.5 g

Na-sitrat 1.0 g

alınır ve 100 mL’ye saf sui le tamamlanır.

3. Çözelti C: 50 mL Çözelti A, 1 mL Çözelti B ile karıştırılarak hazırlanır.

4. Folin-Ciocalteu Ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu, 1 mL saf su ile seyreltilerek hazırlanır.

Yöntem: Protein tayini için iki tüp alınır ve çizelge 3.7’de belirtilen ayıraçlar konur.

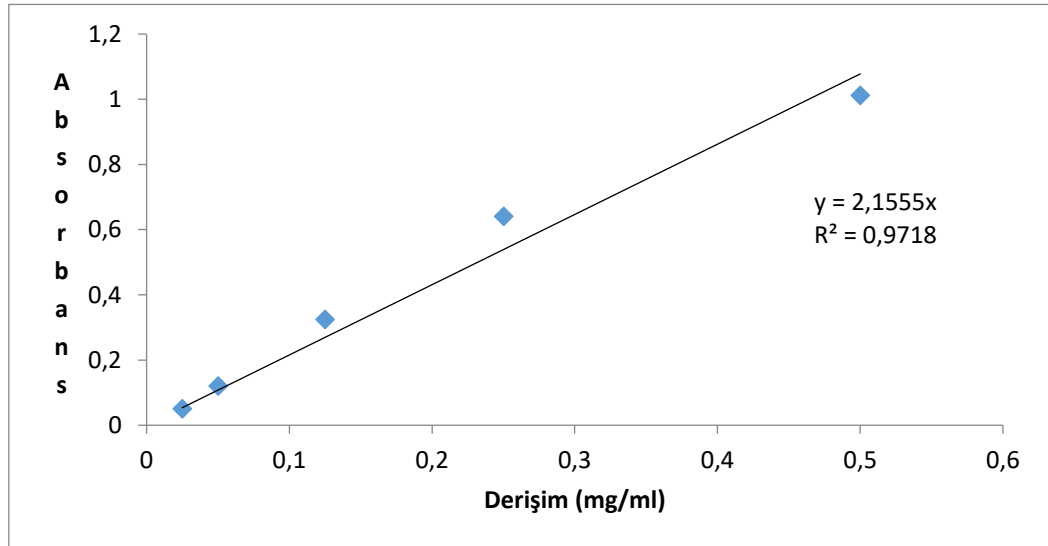
Çizelge 3.7 Protein Yöntemi

Çözeltiler	Kör (mL)	Örnek (mL)
Saf Su	0.50	0.45
Örnek	-	0.05
Çözelti C	2.50	2.50
Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir.		
Folin-Ciocalteu	0.25	0.25

Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra ve spektrofotometrede 750 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Hesaplama

Protein düzeyleri sığır serum albumini kullanılarak hazırlanmış olan standart grafikten yararlanarak hesaplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Standart protein grafiği

3.3. İstatistik

Verilerin istatistiksel analizi, IBM SPSS Statistics 21.0 paket programında One Way-ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ve takiben Student – Newman Keul’s Test (SNK) ve Student-t Test (Independent-Sample t Test) kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

CuSO₄ ve CuO-NP'nin 0.05 mg/L derişimlerinin etkisine 4 ve 21 gün sürelerle bırakılan *O. niloticus*'ta hematolojik (eritrosit, lökosit, hemoglobin ve hematokrit), plazma biyokimyasal (ALT, AST, ALP, kortizol ve glukoz) ve doku oksidatif stres (SOD, CAT, GPX, GR, GST, GSH ve MDA) parametrelerindeki değişimler araştırılmıştır.

4.1. Hematolojik Parametreler

4.1.1. Eritrosit

O. niloticus'un eritrosit sayısı üzerine CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkileri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Etki süreleri dikkate alındığında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde 4 günlük süre sonunda anlamlı bir değişim göstermeyen (P>0.05) eritrosit sayısı, 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05). 21. günün sonunda CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde eritrosit sayısının sırasıyla %21 ve %23 düzeyinde azaldığı saptanmıştır. Aynı etkileşim grubunda süreye bağlı olarak eritrosit sayısının ise hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP grubunda 4 günlük etki süresine oranla 21 günlük etki süresi sonunda anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.1 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un eritrosit sayısı (10⁶/µL) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	1.75±0.02 ax	1.78±0.03 ax
CuSO ₄	1.79±0.04 ax	1.41±0.02 by
CuO-NP	1.81±0.02 ax	1.37±0.04 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. "a ve b" harfleri deney grupları, "x ve y" harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.1.2. Lökosit

Test edilen bakır formlarının ve etkileşim sürelerinin *O. niloticus*'un lökosit sayısı üzerine etkileri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Denenen etki süreleri dikkate alındığında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem 4 hem de 21 günlük süre sonunda CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde lökosit sayısında anlamlı bir değişim belirlenmemiştir (P>0.05). Aynı şekilde test edilen bakır gruplarında etki süreleri de dikkate alındığında ilk etkileşim süresiyle karşılaştırıldığında son etkileşim süresi sonunda lökosit sayılarında istatistiksel bir değişim saptanmamıştır (P>0.05).

Çizelge 4.2 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un lökosit sayısı (10³/µL) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	47.24±1.28 ax	46.74±2.39 ax
CuSO ₄	45.48±2.06 ax	45.63±1.78 ax
CuO-NP	44.93±2.69 ax	43.75±1.61 ax

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. "a" harfi deney grupları, "x" harfi ise etkileşim süreleri arasında istatistiksel bir ayırım olmadığını göstermektedir (P>0.05).

4.1.3. Hemoglobin

Denenen metal gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un hemoglobin düzeyi üzerine etkileri Çizelge 4.3'te verilmiştir. Aynı etki süresi dikkate alındığında CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde 4 günlük süre sonunda anlamlı bir değişim göstermeyen (P>0.05) hemoglobin düzeyi, 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05). Son etkileşim süresi sonunda hemoglobin düzeyi CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde sırasıyla %29 ve %32 düzeyinde azalış göstermiştir. Benzer şekilde her iki bakır grubunda da hemoglobin düzeyleri etkileşim süresine bağlı olarak anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05).

Çizelge 4.3 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un hemogloblin düzeyi (g/dL) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	8.31±0.14 ax	8.38±0.09 ax
CuSO ₄	8.34±0.33 ax	5.94±0.12 by
CuO-NP	8.25±0.19 ax	5.69±1.61 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.1.4. Hematokrit

O. niloticus'un hematokrit düzeyi üzerine bakır gruplarının ve belirlenen sürelerin etkileri Çizelge 4.4'te verilmiştir. İlk etkileşim süresi sonunda hematokrit düzeyi her iki bakır formunun etkisinde anlamlı bir değişim göstermemiştir (P>0.05). Bununla birlikte 21 günlük etki süresi sonunda hematokrit düzeyinin hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP'nin etkisinde istatistiksel olarak azaldığı belirlenmiştir (P<0.05). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bu azalışın CuSO₄ grubunda %22 iken CuO-NP %24 düzeyinde olduğu saptanmıştır. Aynı etkileşim grubunda hematokrit düzeyi üzerine sürenin etkisi incelendiğinde Hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP gruplarında etkide kalma süresi uzadıkça hematokrit düzeyinde önemli azalışlar belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.4 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un hematokrit düzeyi (%) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	31.53±0.88 ax	31.95±0.74 ax
CuSO ₄	30.47±0.66 ax	24.83±0.37 by
CuO-NP	31.14±0.70 ax	24.15±0.49 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.2. Plazmanın Biyokimyasal Parametreleri

4.2.1. ALT

Test edilen etkileşim gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un plazma ALT enzim aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.5'te verilmiştir. 4. günün sonunda CuSO_4 'ün etkisinde önemli bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) ALT aktivitesi, CuO-NP 'nin etkisinde önemli bir artış göstermiştir ($P<0.05$). 21. Günün sonunda ise her iki bakır formunun etkisinde ALT aktivitesinin anlamlı artışlar belirlenmiştir ($P<0.05$). Bu artışın istatistiksel olarak CuSO_4 oranla CuO-NP 'nin etkisinde daha fazla olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Son etkileşim süresi sonunda ALT aktivitesinde CuSO_4 ve CuO-NP sırasıyla %47 ve %88 düzeyinde bir artışa neden olmuştur. Etki süreleri dikkate alındığında ise sadece CuSO_4 grubunda ALT enzim aktivitesinin ilk etkileşim süresi ile karşılaştırıldığında 21 günlük etki süresi sonunda önemli bir artış gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.5 CuSO_4 ve CuO-NP 'nin *O. niloticus*'un plazma ALT aktivitesi (U/L) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	18.21±0.48 ax	18.44±0.77 ax
CuSO_4	20.49±0.93 ax	27.07±0.68 by
CuO-NP	31.15±0.74 bx	34.66±0.56 cx

Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. "a, b ve c" harfleri deney grupları, "x ve y" harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler $P<0.05$ düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.2.2. AST

Denenen bakır gruplarının ve etkide kalma sürelerinin *O. niloticus*'un plazma AST enzim aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. İlk etkileşim süresi sonunda anlamlı bir değişim göstermeyen ($P>0.05$) AST aktivitesinde 21. günün

sonunda her iki bakır grubunu etkisinde anlamlı artışlar saptanmıştır ($P<0.05$). Bu artış istatistiksel olarak CuO-NP'nin etkisinde CuSO₄ oranla daha fazla olmuştur ($P<0.05$). 21 günlük süre sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında AST aktivitesinde CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde sırasıyla %32 ve %54 düzeyinde bir artış saptanmıştır. Ayrıca etkide kalma süresinin uzamasıyla AST aktivitesinin her iki bakır grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı belirlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.6 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un plazma AST aktivitesi (U/L) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	136±4.5 ax	128±5.6 ax
CuSO ₄	127±6.1 ax	169±3.9 by
CuO-NP	141±5.4 ax	197±6.1 cx

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a, b ve c” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler $P<0.05$ düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.2.3. ALP

Test edilen bakır gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un plazma ALP enzim aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP etkisinde ilk etkileşim süresi sonunda ALP enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir değişim saptanmamıştır ($P>0.05$). Bununla birlikte 21. günün sonunda ALP aktivitesi her iki bakır grubunun etkisinde anlamlı olacak şekilde bir artış göstermiştir ($P<0.05$). Son etki süresi sonunda ALP aktivitesindeki bu artışın CuSO₄ ve CuO-NP gruplarında sırasıyla %34 ve %40 düzeyinde olduğu hesaplanmıştır. Belirli bir bakır grubunda etki de kalma süresinin ALP aktivitesi üzerine etkilerini dikkate aldığımızda ilk etkileşim süresine göre son etkileşim süresi sonunda enzim aktivitesi her iki bakır grubunda da anlamlı bir artış göstermiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.7 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un plazma ALP aktivitesi (U/L) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	25.34±0.51 ax	24.79±0.63 ax
CuSO ₄	24.89±0.47 ax	33.21±0.70 by
CuO-NP	24.60±0.39 ax	34.59±0.66 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.2.4. Kortizol

O. niloticus'un plazma kortizol düzeyi üzerine bakır gruplarının ve denenen sürelerin etkileri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her iki etkileşim süresi sonunda da kortizol düzeyi, hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP etkisinde anlamlı bir artış göstermiştir (P<0.05). Bu artışların 4. günün sonunda daha fazla olduğu saptanmıştır. 4 günlük etki süresi sonunda kortizol düzeyi, CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde sırasıyla %47 ve %51 düzeyinde bir artış göstermiştir. Etkide kalma süresi dikkate alındığında ise her iki bakır grubunda da 4. güne oranla 21. günün sonunda kortizol düzeyinde istatistiksel olarak önemli bir değişim belirlenememiştir (P>0.05).

Çizelge 4.8 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un plazma kortizol düzeyi (ng/dL) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	4.67±0.17 ax	4.78±0.11 ax
CuSO ₄	6.86±0.13 bx	6.16±0.22 bx
CuO-NP	7.04±0.21 bx	6.20±0.19 bx

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları arasındaki istatistiksel ayırımı göstermektedir (P<0.05). “x” harfi ise etkileşim süreleri arasında istatistiksel ayırım olmadığını göstermektedir (P>0.05).

4.2.5. Glukoz

Denenen etkileşim gruplarının ve etkide kalma sürelerinin *O. niloticus*'un plazma glukoz düzeyleri üzerine etkileri Çizelge 4.9'da verilmiştir. Hem 4 hem de 21 günlük süre sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında glukoz düzeyi her iki bakır grubunun etkisinde de önemli bir artış göstermiştir ($P<0.05$). Bu artışın ilk etkileşim süresi sonunda daha fazla olduğu belirlenmiştir. 4 günlük süre sonunda glukoz düzeyinde CuSO_4 ve CuO-NP 'nin etkisinde sırasıyla %49 ve %64 düzeyinde bir artış saptanmıştır. Etkide kalma süresi dikkate alındığında ise her iki bakır grubunda da 4. güne oranla 21. günün sonunda glukoz düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.9 CuSO_4 ve CuO-NP 'nin *O. niloticus*'un plazma glukoz düzeyi (mg/dL) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Kontrol	51.44±0.63 ax	53.61±0.71 ax
CuSO_4	81.88±0.74 bx	75.18±0.46 bx
CuO-NP	84.25±0.52 bx	76.09±0.84 bx

Veriler aritmetik ortalama \pm standart hata şeklinde verilmiştir. "a ve b" harfleri deney grupları arasındaki istatistiksel ayrımı göstermektedir ($P<0.05$). "x" harfi ise etkileşim süreleri arasında istatistiksel ayrım olmadığını göstermektedir ($P>0.05$).

4.3. Oksidatif Stres Parametreleri

4.3.1. CAT

Test edilen etkileşim gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu CAT aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.10'da verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her iki dokudaki CAT enzim aktivitesi, hem CuSO_4 ve hem de CuO-NP etkisinde 4 günlük süre sonunda önemli bir değişim göstermezken ($P>0.05$), 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış göstermiştir ($P<0.05$). Son etkileşim süresi sonunda CAT aktivitesinde, CuSO_4 ve CuO-NP 'nin

etkisinde karaciğerde sırasıyla %38 ve %46; solungaç dokusunda ise sırasıyla %25 ve %29 düzeylerinde azalışlar saptanmıştır. Yine etkide kalma süreleri dikkate alındığında da her iki doku CAT aktivitesi her iki bakır grubunda da 4 günlük süreye oranla 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış göstermiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.10 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	470±13 ax	461±15 ax
CuSO ₄	481±16 ax	285±20 by
CuO-NP	493±21 ax	247±16 by
Solungaç		
Kontrol	165±6.8 ax	172±3.8 ax
CuSO ₄	171±5.5 ax	129±4.4 by
CuO-NP	166±4.7 ax	122±2.9 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler $P<0.05$ düzeyindeki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir.

4.3.2. SOD

Test edilen etkileşim gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu SOD aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Belirli bir etki süresinde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CuSO₄ ve CuO-NP'nin karaciğer ve solungaç dokusunda SOD aktivitesinde ilk etkileşim süresi sonunda istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmadığı ($P>0.05$); bununla birlikte 21 günlük etki süresi sonunda anlamlı azalışlara neden olduğu saptanmıştır ($P<0.05$). Son etkileşim süresi sonunda SOD aktivitesinde, CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde karaciğerde sırasıyla %41 ve %42; solungaç dokusunda ise sırasıyla %36 ve %38 düzeylerinde azalışlar saptanmıştır. Yine etkide kalma süreleri dikkate alındığında da

her iki doku SOD aktivitesinde her iki bakır grubunda da 4 günlük süreye oranla 21 günlük süre sonunda anlamlı bir azalış belirlenmiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.11 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku SOD aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	27.40±0.62 ax	27.98±0.43 ax
CuSO ₄	27.89±0.54 ax	16.65±0.34 by
CuO-NP	26.71±0.78 ax	16.24±0.59 by
Solungaç		
Kontrol	21.70±0.51 ax	21.95±0.44 ax
CuSO ₄	20.97±0.34 ax	14.13±0.26 by
CuO-NP	22.06±0.65 ax	13.60±0.51 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler $P<0.05$ düzeyindeki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir.

4.3.3. GPX

Denenen etkileşim gruplarının ve etkide kalma sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu GPX aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.12'de verilmiştir. Karaciğer GPX aktivitesi her iki bakır grubunun etkisinde 4. günün sonunda anlamlı bir azalış gösterirken ($P<0.05$); 21. günün sonunda kontrol grubuna göre önemli bir değişim göstermemiştir ($P>0.05$). İlk etkileşim süresi sonunda karaciğer GPX aktivitesi CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde sırasıyla %29 ve %39 düzeyinde bir azalış saptanmıştır. Solungaç GPX aktivitesinde ise her iki sürenin sonunda ve her iki bakır grubunun etkisinde istatistiksel olarak önemli bir değişim belirlenmemiştir ($P>0.05$). Sürenin etkisi dikkate alındığında ise sürenin uzamasına bağlı olarak karaciğer GPX aktivitesi CuSO₄ ve CuO-NP grubunda anlamlı bir artış göstermiştir ($P<0.05$).

Çizelge 4.12 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku GPX aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	0.51±0.02 ax	0.52±0.04 ax
CuSO ₄	0.36±0.04 bx	0.50±0.04 ay
CuO-NP	0.31±0.03 bx	0.48±0.05 ay
Solungaç		
Kontrol	0.31±0.03 ax	0.30±0.02 ax
CuSO ₄	0.30±0.03 ax	0.34±0.04 ax
CuO-NP	0.33±0.02 ax	0.31±0.02 ax

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir.

4.3.4. GR

Test edilen etkileşim gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu GR aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.13'te gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında GR aktivitesinin hem CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde 4. günün sonunda her iki dokuda da anlamlı olacak şekilde arttığı (P<0.05); 21. günün sonunda ise karaciğerde önemli olacak şekilde azaldığı belirlenmiştir (P<0.05). GR aktivitesi CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde ilk etkileşim süresi sonunda karaciğerde sırasıyla %28 ve %33; solungaç dokusunda ise sırasıyla %29 ve %34 düzeyinde artarken son etki süresi sonunda karaciğerde sırasıyla %25 ve %26 düzeyinde azalmıştır. Belirli bir grubun etkisinde her iki doku GR aktivitesinin her iki bakır grubunda da etkide kalma sürelerinin uzamasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.13 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku GR aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	0.081±0.003 ax	0.085±0.004 ax
CuSO ₄	0.104±0.004 bx	0.064±0.005 by
CuO-NP	0.108±0.003 bx	0.063±0.003 by
Solungaç		
Kontrol	0.035±0.002 ax	0.034±0.003 ax
CuSO ₄	0.045±0.003 bx	0.033±0.002 ay
CuO-NP	0.047±0.002 bx	0.030±0.005 ay

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir.

4.3.5. GST

Denenen etkileşim gruplarının ve etkide kalma sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu GST aktivitesi üzerine etkileri Çizelge 4.14'te verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP'nin etkisinde GST aktivitesinde karaciğerde 4. günde anlamlı bir artış (P<0.05) ile 21. günde anlamlı bir azalışın olduğu (P<0.05) belirlenirken; solungaç dokusunda ise 4. günde anlamlı bir artış (P<0.05) ile 21. günde önemli bir değişimin olmadığı (P>0.05) belirlenmiştir. GST aktivitesi CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde ilk etkileşim süresi sonunda karaciğerde sırasıyla %27 ve %54; solungaç dokusunda ise sırasıyla %26 ve %28 düzeyinde artarken son etki süresi sonunda karaciğerde sırasıyla %22 ve %25 düzeyinde azalmıştır. Etkileşim süreleri dikkate alındığında ise her iki doku GST aktivitesi hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP grubunda da etkide kalma sürelerinin uzamasıyla anlamlı bir azalış göstermiştir (P<0.05).

Çizelge 4.14 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku GST aktivitesi (U/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	29.18±0.84 ax	31.41±0.64 ax
CuSO ₄	37.14±0.69 bx	24.49±0.33 by
CuO-NP	44.85±0.51 cx	23.55±0.48 by
Solungaç		
Kontrol	14.76±0.57 ax	15.28±0.63 ax
CuSO ₄	18.61±0.73 bx	14.91±0.49 ay
CuO-NP	18.89±0.89 bx	15.13±0.54 ay

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a, b ve c” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.3.6. GSH

Test edilen etkileşim gruplarının ve etki sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu GSH düzeyleri üzerine etkileri Çizelge 4.15'te gösterilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP'nin her iki doku GSH düzeylerini anlamlı olacak şekilde 4. günün sonunda arttırdığı (P<0.05), 21. günün sonunda ise azalttığı belirlenmiştir (P<0.05). CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde GSH düzeyinin ilk etkileşim süresi sonunda karaciğerde sırasıyla %30 ve %35, solungaçta ise %24 ve %32 düzeylerinde arttığı saptanırken 21 günlük süre sonunda karaciğerde sırasıyla %24 ve %39; solungaçta ise %20 ve %21 düzeylerinde azalttığı saptanmıştır. Etkide kalma sürelerinin doku GSH düzeylerine etkileri dikkate alındığında ise hem karaciğer hem de solungaç GSH düzeylerinin sürenin uzamasına bağlı olarak her iki bakır grubunda da önemli olacak şekilde azaldığı belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.15 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku GSH düzeyi (µmol/g protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	2.61±0.14 ax	2.72±0.18 ax
CuSO ₄	3.40±0.23 bx	2.08±0.15 by
CuO-NP	3.52±0.19 bx	1.65±0.22 cy
Solungaç		
Kontrol	1.49±0.05 ax	1.54±0.04 ax
CuSO ₄	1.85±0.04 bx	1.23±0.03 by
CuO-NP	1.96±0.05 bx	1.22±0.03 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a, b ve c” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayırımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayırımı ifade etmektedir.

4.3.7. MDA

Denenen etkileşim gruplarının ve etkide kalma sürelerinin *O. niloticus*'un karaciğer ve solungaç dokusu MDA düzeyleri üzerine etkileri Çizelge 4.16'da verilmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde her iki doku MDA düzeylerinin 4. günün sonunda anlamlı bir değişim göstermediği (P>0.05), 21. günün sonunda ise önemli olacak şekilde arttığı belirlenmiştir (P<0.05). Son etkileşim süresi sonunda CuSO₄ ve CuO-NP'nin etkisinde MDA düzeyi; karaciğerde sırasıyla %42 ve %46; solungaç dokusunda ise sırasıyla %23 ve %28 düzeyinde bir artış göstermiştir. Belirli bir grubun etkisinde her iki doku MDA düzeyinin her iki bakır grubunda da etkide kalma sürelerinin uzamasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir (P<0.05).

Çizelge 4.16 CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un doku MDA düzeyi (nmol/mg protein) üzerine etkileri

Gruplar	4 Gün	21 Gün
Karaciğer		
Kontrol	2.11±0.03 ax	2.04±0.03 ax
CuSO ₄	2.06±0.02 ax	2.89±0.04 by
CuO-NP	2.07±0.04 ax	2.97±0.03 by
Solungaç		
Kontrol	1.73±0.02 ax	1.74±0.03 ax
CuSO ₄	1.75±0.03 ax	2.13±0.02 by
CuO-NP	1.72±0.02 ax	2.22±0.04 by

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata şeklinde verilmiştir. “a ve b” harfleri deney grupları, “x ve y” harfleri ise etkileşim süreleri arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harfler P<0.05 düzeyindeki istatistiksel ayrımı ifade etmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya çapında tilapyalar sazanlardan sonra kültürü yapılan en büyük ikinci balık grubudur ve hemen her balık çiftliğinde yetiştirilebilmektedir. Nil tilapyası *O. niloticus* detritus, fitoplankton ve zooplankton ile beslenen omnivor bir balıktır ve bu besinlerle birlikte bakır bileşiklerini de içeren çevresel kirleticileri vücuduna alabilmektedir. Nil tilapyası toksikolojik çalışmalarda kullanılan en yaygın tatlı su balıklarından biridir. Kültürü ve laboratuvar ortamlarına adaptasyonu kolay, çevresel değişkenlere dirençli olduğundan bu tür toksikolojik araştırmalar için iyi bir model organizmadır [9]. Sunulan bu çalışmada da *O. niloticus* CuSO₄ ve CuO-NP'nin toksik etkilerini değerlendirmek için model bir organizma olarak kullanılmıştır.

Sucul ekosistemler hemen tüm kirleticiler için son uğrak yer olup bu ortamlara giren ve her geçen gün de derişimi artan toksikantlar nedeniyle aquatik organizmalar ciddi bir tehdit altında kalmaktadır. Tatlı su ve deniz balıklarının gerek geleneksel kirleticiler olan ağır metaller ve pestisitler gibi gerekse de yeni bir kirletici grubu olan nanopartiküllere karşı hayatta kalabilmeleri ve yaşamlarını devam ettirebilmeleri her şeyden önce adaptasyon yetenekleri ve hücrel savunma mekanizmalarıyla oldukça yakın ilişkilidir. Bu kirleticilerin balıklarda iç dengeyi bozduğu, moleküler, biyokimyasal ve hücrel düzeylerde ciddi toksik etkilere ve hatta ölümlere bile yol açtığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Sunulan araştırmada 0.05 mg/L CuSO₄ ve CuO-NP etkisinde ve 21 günlük etkileşim süresi boyunca *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir. Bununla birlikte her iki bakır formunun etkisinde bu balıklarda hematolojik, plazma biyokimyasal ve doku oksidatif stres parametrelerinde önemli subletal değişiklikler belirlenmiştir. Bu ciddi etkilere karşı *O. niloticus*'ta her iki bakır formlarının etkisinde ölüm gözlenmemesi bu balıkların güçlü detoksifikasyon ve hücrel savunma yeteneklerine bağlı olabilir. Gerçekten de bu canlılar kirleticilerin yoğun olarak bulunduğu ortamlarda bile güçlü immün sistemleri ve yanıt mekanizmalarıyla yaşamlarını sürdürebilmektedir. Çalışmamızla benzer şekilde Tunçsoy ve ark. [64] da yaptıkları araştırmada 15 gün süre ile 20 µg/L CuO-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta doku biyokimyasal parametrelerinde bu metal oksit nanopartikülün önemli toksik etkisine rağmen mortalite gözlenmemiştir. Yine Fırat ve

Bozat [74] yaptıkları araştırmada da 4 ve 14 günlük sürelerle 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta mortalite gözlenmemiştir.

Günümüzde geleneksel metallerin ve bu metallerin nano boyutlu formlarının sucul ekosistemlerdeki derişimleri giderek artmaktadır. Bu kirleticiler hem su kalitesinin bozulmasına neden olmakta hem de içinde yaşayan organizmalara zararlar vermektedir. Sucul organizmaların önemli bir grubunu oluşturan balıklar suda bulunan metalleri ve bunların nano boyutlu formlarını genellikle solungaçları aracılığıyla almakta diğer dokulara taşınımı kan yoluyla olmaktadır. Bu nedenle balık solungaçları, kan dokusu ve toksikantların detoksifikasyonundan sorumlu olan karaciğer dokusu metallerin ve metal oksit nanopartiküllerin etkisine en açık ve belirgin toksik etkilerin görüldüğü dokular olarak dikkate alınmaktadır. Sunulan çalışmada da CuSO₄ ve CuO-NP'nin balıklarda meydana getirdiği toksik etkilerin değerlendirilmesinde kan, solungaç ve karaciğer dokuları hedef dokular olarak seçilmiştir.

Kanın hematolojik ve plazma biyokimyasal parametreleri organizmanın genel sağlık durumu hakkında yararlı bilgiler sağlayan önemli sağlık belirteçleri olup balıklarda toksik kimyasalların ve çevresel stres yapıcıların toksikolojik etkilerini anlamak ve değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır [38]. Kan hücre sayıları ve plazma/serum parametreleri çevresel kirleticilerin toksik etkileri için erken uyarıcı sistemler olarak geniş bir şekilde kullanılmakta ve organizmanın sağlığı ve immün sistemi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır [75]. Balıkların eritrosit, lökosit, hemoglobin ve hematokrit gibi hematolojik parametreleri su ortamındaki çeşitli kirleticilere karşı oldukça duyarlı indikatörler olarak atfedilmektedir [76].

Eritrositler rutin olarak yeni kimyasalların toksisitesini çalışmak için model hücreler olarak kullanılmaktadır. Ayrıca balık eritrositleri tipik bir vücut hücresi gibi nükleous, mitokondri ve diğer organelleri içermekte ve kolayca izole edilmektedirler [8]. Sunulan çalışmada hem CuSO₄ ve hem de CuO-NP'nin etkisinde *O. niloticus*'un eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit düzeyi anlamlı azalış gösterirken lökosit sayısında önemli bir değişim belirlenmemiştir. Test edilen bakır bileşiklerinin etkisinde eritrosit, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde meydana gelen azalışların bu metallerin neden olduğu eritropoiezis, hemosentez ve osmoregülasyondaki

hasarlarla yada hematopoetik organlardaki eritrosit yıkım hızındaki artışla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Eritrosit ve hemoglobin düzeylerindeki azalışlar CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'ta anemik durumlara neden olduğunu da göstermektedir. Mekkawy ve ark. [38], balıklarda toksikantların etkisinde eritrosit sayılarının azalmasına yol açan bu olgun kan hücrelerinin parçalanması, eritrosit sentezinin baskılanması, hem-sentezinin ve demir-sentez mekanizmalarının bozulması sonucunda anemiye neden olacağını belirtmişlerdir. Harabawy ve Ibrahim [77] de balıklarda çevresel kirleticilerin en belirgin toksik etkilerinden biri olan anemik durumun bu toksikantların kan dokusu üzerine olan olumsuz etkilerinin bir göstegeci olduğunu ve kanın oksijen taşıma kapasitesinde azalmalara neden olarak hücrelerde oksijen kıtlığına ve canlının da acı çekmesine yol açtığını vurgulamıştır. Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak Fırat ve Kargin [37] de çinko ve kadmiyumun tek başına ve birlikte etkisine 7 ve 28 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'ta eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde önemli azalışlar belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu hematolojik parametrelerdeki azalışların balıklarda anemiye neden olduğunu ve bu kan parametrelerinin balıkların genel fizyolojik ve patolojik durumlarını değerlendirmek için kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Farklı çalışmalarda da hem metallerin hem de metal oksit nanopartiküllerin etkisinde balık hematolojik parametrelerin önemli değişimler belirlenmiştir. *C. auratus*'ta 40 µg/ml Cu₂O-NP derişiminin kan hücrelerine toksik olduğu ve eritrosit zarlarında ciddi hasarlara neden olduğu saptanmıştır [54]. Abdel – Khalek ve ark. [61] yaptığı araştırmada da 30 gün süreyle CuO ve CuO-NP'nin subletal derişimlerinin etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta eritrosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit düzeylerinde anlamlı olacak şekilde azaldığı rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada da 0.79 ve 1.57 mg/L CuO etkisine 21 gün süreyle bırakılan *M. cephalus*'ta hematolojik parametrelerin bakırdan etkilendiği ve eritrosit sayısı ile hemoglobin ve hematokrit düzeylerinin önemli olacak şekilde azalış belirlenmiştir [65].

Çevresel kirleticilere yanıtta biyokimyasal parametrelerdeki değişimler hızlı bir şekilde meydana gelmekte ve bu nedenle bu parametreler kimyasalların toksik etkilerinin biyobelirteçleri olarak atfedilmektedir [78]. Bu biyokimyasal parametrelerden ALT, AST ve ALP karaciğer kökenli enzimlerdir. Bu enzimler hücre

içi enzimlerdir. ALT, AST ve ALP gibi enzimler kirleticilere duyarlı olduklarından hepatik hücre hasarlarının ve çoğu karaciğer hastalıklarının değerlendirilmesinde anahtar enzimler olarak önerilmektedir [79]. ALT ve AST aminoasit metabolizmasına katılan ve aynı zamanda stres altındaki organizmalarda karbonhidrat olmayan kaynaklardan enerji elde edilmesi süreçlerinde de rol oynayan glukoneojenez enzimler olarak da ifade edilmektedir. Kan serumundaki ALT, AST ve ALP enzim düzeyleri düşüktür. Bununla birlikte karaciğerde hücre hasarına neden olabilecek toksikantların varlığında hepatosit hücre zarlarının hasar almasına bağlı olarak hücreler arası sıvıya oradan da kana geçerek düzeyleri artış gösterebilmektedir. Sunulan araştırmada da özellikle 21 günlük etki süresi sonunda hem CuSO₄ hem de CuO-NP etkisinde *O. niloticus*'un plazma ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri anlamlı artışlar göstermiştir. Bu plazma enzim aktivitesindeki artışların her iki metal formunun balık karaciğerinde meydana getirdiği hücre hasarına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Fırat ve ark. [80], 4 ve 21 günlük sürelerle 0.05 mg/L bakır ve kurşun etkisine bırakılan *O. niloticus*'un serum ALT, AST ve ALP enzim aktivitelerine artışlar belirlemişlerdir. Araştırmacılar balık serumundaki bu enzim aktivitesindeki artışların esas olarak metallerin neden olduğu karaciğer hasarının bir sonucu olarak karaciğer sitosolünden kana bu enzimlerin geçmesiyle oluştuğunu vurgulamışlardır.

Balıklar üzerine metallerin ya da metal oksit nanopartiküllerin etkileri ile ilgili birçok çalışmada da serum/plazma enzim aktivitelerinde artışların olduğu rapor edilmiştir. Zn ve Zn-NP'nin subletal etkisine farklı sürelerle bırakılan *O. niloticus*'un serum ALT, AST ve ALP enzim aktivitelerinde önemli artışlar saptanmıştır [56]. Ateş ve ark. [62] de demir oksit nanopartiküllerin *O. niloticus*'ta serum ALT ve AST enzim aktivitelerini arttırdığını rapor etmiştir. Başka bir çalışmada da CuO ve CuO-NP'nin etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta serum ALT, AST ve ALP enzim aktiviteleri artış göstermiştir [57]. Yine Fırat ve Kargin [81] de Zn ve Cd'nin 7 ve 14 günlük etkisinde *O. niloticus*'un serum ALT ve AST enzim aktivitelerinin bu metallerin hepatoksik etkilerinin bir sonucu olarak arttığını saptamışlardır.

Serum/plazma glukoz ve kortizol düzeylerindeki değişimler balıklarda stres biyobelirteçleri olarak kullanılan önemli parametrelerdir [80]. Stres durumunda balık beyni aşırı miktarda katekolamin ve kortikosteroid hormon salgılar ve bunlar da

karaciğer glikojeninin yıkımını artırarak kan glukoz düzeylerinin yükselmesine neden olur [82]. Toksikantların etkisinde balıklarda ortaya çıkan stres durumlarıyla baş edebilmek için acil enerjiye gereksinim vardır. Glukoz ve kortizol birer stres metaboliti olup enerji gereksinim süreçlerinde aktif rol oynamaktadırlar.

Sunulan çalışmada hem 4 hem de 21 günlük süreler sonunda CuSO₄ ve CuO-NP etkisinde *O. niloticus*'un plazma glukoz ve kortizol düzeyleri önemli artışlar göstermiştir. Glukoz ve kortizol düzeylerinin bakırın neden olduğu stres durumlarında artan enerji ihtiyacının karşılanması için arttığı düşünülmektedir. Çalışma sonuçlarımızla benzer şekilde Fırat ve ark. [80] de yürüttüğü araştırmalarında bakır ve kurşunun *O. niloticus*'un serum glukoz ve kortizol düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. Araştırmacılar glukoz ve kortizol düzeylerindeki artışların metallerin neden olduğu stresle baş edebilmek için önemli süreçler olduğunu vurgulamışlardır. Iwama ve ark. [83] de bir stres hormonu olan kortizolün balıklarda glukoneojenez ve glikojenolizis süreçlerindeki rolleriyle kan glukoz düzeylerini arttırdığını ve stresle baş edebilmek için gerekli enerjinin karşılanmasında önemli görevleri olduğunu belirtmiştir.

Birçok çalışmada da metallerin ve metal nanopartiküllerin balıklarda plazma glukoz ve kortizol düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. 7, 14 ve 28 günlük sürelerle hem Zn ve hem de Zn-NP'nin LC₅₀ değerinin 1/2'sine maruz bırakılan *O. niloticus*'ta serum glukoz düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir [56]. Yine CuO ve CuO-NP'nin etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta serum glukoz düzeyleri anlamlı artışlar göstermiştir [56]. Başka bir çalışmada da 28 gün süreyle Ag-NP'nin düşük ve yüksek derişimlerinin etkisine bırakılan *O. mykiss*'in plazma kortizol düzeylerinin arttığı saptanmıştır [84]. Canli ve ark. [85] da yaptığı araştırmalarında 14 günlük 25 mg/L Al₂O₃-NP etkileşiminin *O. niloticus*'un serum kortizol düzeylerini attırdığını rapor etmişlerdir. Serum glukoz ve kortizol düzeylerinde artışlar keza bakır etkisinde *Prochidolus lineatus* [86] ve kurşun etkisinde *O. niloticus*'ta [87] belirlenmiştir.

Doğal ya da antropojenik kaynaklardan su ekosistemlerine giren ağır metaller, pestisitler ve metal bazlı nanopartikülleri içeren kirleticiler ROT'ları üreterek aquatik organizmalarda oksidatif strese neden olabilmektedirler. Ağır metallerin ve metal bazlı nanopartiküllerin balıklarda ROT üretimini indüklediği birçok çalışmada rapor edilmiştir [32,48,53]. Superoksit anyonu ve hidroksil gibi oldukça tehlikeli radikalleri

içeren ROT'lar hücrelerde ciddi hasarlara neden olmaktadır. Toksikantların etkisinde canlı hücrelerde meydana gelen oksidatif stres lipidler, proteinler, enzimler ve karbonhidratlar gibi biyomoleküllerin yapısında ve işlevlerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Oksidatif stresle baş edebilmek için ROT oluşumunu engelleyen ya da üretilen ROT'ları temizleyen ve yahut da onların neden olduğu hücrel hasarları tamir eden mekanizmalar hücrelerde bulunmaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlilerinden biri antioksidan savunma sistemleridir. Bu sistem diğer yüksek yapılı omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da CAT, SOD, GPX, GR ve GST gibi enzimatik ya da GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşmaktadır [88]. Birçok araştırmacı tarafından hücrel antioksidan savunma sistemlerinin ağır metallerin ve metal-bazlı nanopartiküllerin neden olduğu oksidatif hasarların biyobelirteçleri olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır [64,65,74].

SOD ve CAT, ROT ve diğer serbest radikallere karşı hücrenin ilk savunma hattını oluşturmaktadır [89]. Bu iki antioksidan enzim hücrelerin oksidatif stresten hasar almaması ve korunması süreçlerinde önemli biyolojik roller üstlenmiştir. SOD ve CAT, toksikantlar tarafından oluşturulan ROT'ların hücrel eliminasyonundan sorumlu olan kilit antioksidan enzimlerdir [90]. SOD hücreler için potansiyel olarak oldukça toksik olan ve yüksek reaktif özelliğine sahip süperoksit radikalini hidrojen perokside dönüşümünü katalize ederek hücreleri bu tehlikeli radikal etkilerinden korumaktadır. Bu esnada oluşan H_2O_2 'nin de hücreden uzaklaştırılması normal hücre fonksiyonları için elzemdir. H_2O_2 hücrede bilinen en toksik ve en reaktif radikal olan hidroksil radikale dönüşme potansiyeline sahiptir. CAT bu tehlikeli radikale dönüşmeden önce H_2O_2 'yi suya ve moleküler oksijene dönüştürerek hücrelerin antioksidan savunma sistemlerinde hayati bir rol oynamaktadır [91].

Sunulan çalışmada $CuSO_4$ ve $CuO-NP$ 'nin etkisinde 21 günlük süre sonunda hem karaciğer hem de solungaç SOD ve CAT aktivitesi anlamlı bir azalış göstermiştir. Bakırın etkisinde SOD ve CAT aktivitesinde meydana gelen azalışların bu enzimlerin antioksidan savunmada oynadıkları biyolojik rolleri dikkate alındığında süperoksit ve hidroksil radikallerinin toksik etkilerine karşı hücrelerin savunma yeteneklerinde bir azalmaya neden olduğu ve hücreleri bu radikallerin toksik etkilerine karşı açık hale getirdiği düşünülmektedir. Fırat ve Bozat [74] da yaptıkları çalışmalarında 4 ve 14 gün

sürelerle 1.0 ve 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'un solungaç dokusu SOD ve CAT aktivitesinin ilk etkileşim süresi sonunda anlamlı olacak şekilde azaldığı belirlenmiştir. Araştırmacılar metal oksit nanopartiküllerin toksik etkilerininin bir sonucu olarak meydana gelen antioksidan enzim aktivitelerindeki bu azalışların süperoksit ve H₂O₂ gibi ROT'ların yeterli düzeyde uzaklaştırılmamalarından kaynaklı hücrelerin bu nanopartiküllerin olumsuz etkilerine karşı savunmasız kaldıklarını ifade etmişlerdir. Çalışmamıza benzer sonuçlar Tunçsoy ve ark. [64] yürüttüğü çalışmada da gözlenmiştir. Araştırmacılar 20 µg/L CuO-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer dokularında SOD ve CAT enzim aktivitesinin azaldığını saptamışlardır.

Birçok balık türünde yapılan çalışmalarda metallerin ya da metal bazlı nanopartiküllerin tipine etki süresine ve derişimlerine bağlı olarak SOD ve CAT aktivitesinde önemli değişikliklerin olduğu rapor edilmiştir. 100 ve 200 mg/L TiO₂-NP, *C. carpio*'nun solungaç ve karaciğer SOD aktivitesini inhibe etmiştir [92]. Abdel-Khalek ve ark. [57] 30 gün süreyle 7.5 mg/L CuO-NP etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta karaciğer dokusu SOD ve CAT aktivitesi azaldığını saptamışlardır. Yine başka bir çalışmada da 160 ve 320 mg/L CuO-NP etkisine 4 gün süreyle bırakılan *C. auratus*'un karaciğer SOD ve CAT aktivitesi azalış göstermiştir [93]. CAT aktivitesinin *Danio rerio*'nun dokularında ZnO-NP [94] ve *Tilapia zillii*'de ise Ag-NP etkisinde [95] azaldığı rapor edilmiştir.

GPX, H₂O₂ tarafından indüklenen hasarlara karşı hücreyi koruyan bir enzim olup H₂O₂'yi GSH varlığında suya dönüşümünü katalize etmektedir (H₂O₂ + 2GSH → GSSG + 2H₂O) [96]. Bu nedenle CAT gibi bu enzim de ROT'lara karşı hücresel savunmada önemli bir rol oynamaktadır. GPX aktivitesindeki değişimler hücrelerin toksikantlara karşı savunma yeteneklerini etkilemektedir. Çalışmamızda *O. niloticus*'un karaciğer GPX aktivitesi hem CuSO₄ hem de CuO-NP etkisinde 4 günlük süre sonunda azalmıştır. Enzim aktivitesindeki bu azalış dönüşüme uğramayan H₂O₂'nin hücrede birikmesine ve bunun hücrelere olumsuz etkilere neden olduğu düşünülmektedir. Gerek CAT ve gerekse de GPX enzimlerinin bakırın etkisinde azalan aktivitelerine bağlı olarak H₂O₂'nin yeteri kadar uzaklaştırılmaması bu ROT'un hidroksil radikaline dönüşebilmesinin ve böylece de hücre bileşenlerinde

hasarlara neden olmasının önünü açtığı öngörülmektedir. Sonuçlarımızla uyumlu olarak Fırat ve Bozat [74] da 5.0 mg/L TiO₂-NP'nin 4 günlük etkisinde *O. niloticus*'un solungaç dokusu GPX aktivitesinde azalışlar belirlemişlerdir. Araştırmacılar GPX aktivitesindeki azalışların metal oksit nanopartikülün toksik etkilerinin ya da azalan GSH düzeyleriyle ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. Afifi ve ark. [95] da Ag-NP etkileşimini takiben *O. niloticus* ve *T. zillii*'nin beyin dokusu GPX aktivitelerinde azalışlar belirlemişlerdir. 14 gün süreyle farklı derişimlerde ZnO-NP etkisine bırakılan *C. carpio*'da 50 mg/L nanopartikül derişiminin balıklarda karaciğer, solungaç, bağırsak ve beyin dokuları GPX aktivitelerini azalttığı rapor edilmiştir [53].

GR, GSH metabolizmasında önemli bir oynamaktadır. Bu enzim NADPH varlığında okside glutasyonu redükte glutatyona dönüşümünü katalizlemektedir. GR de diğer antioksidan enzimler gibi oksidatif hasara karşı birincil savunma hattını oluşturan bir antioksidan olarak oksidatif strese karşı hücreleri korumaktadır [97]. Sunulan çalışmada GR aktivitesinin hem CuSO₄ hem de CuO-NP etkisinde 4 günlük süre sonunda solungaç ve karaciğer dokusunda arttığı 21 günlük süre sonunda ise karaciğerde azaldığı belirlenmiştir. Her iki bakır formunun etkisinde gözlemlenen GR aktivitesindeki artışların bir antioksidan yanıt olarak oluştuğu bununla birlikte azalan enzim aktivitelerinin ise bakırın GR üzerine olan doğrudan/dolaylı toksik etkisinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde 5.0 mg/L TiO₂-NP etkisinde *O. niloticus*'un solungaç dokusu GR aktivitesi de 4 ve 14 günlük süreler sonunda artış göstermiştir [74]. Araştırmacılar GR'nin hücrel antioksidan savunmada önemli bir rol oynadığını bu nedenle de enzim aktivitesindeki artışların metal oksit nanopartiküllerin toksisitesine karşı koruyucu bir mekanizma olarak meydana geldiğini öngörmüşlerdir. Villarreal ve ark. [98] da 0.5 and 5.0 mg/L CuO-NP'nin *O. mossambicus*'un karaciğer dokusu GR aktivitesinde artışlara neden olduğunu belirlemişlerdir. Bununla birlikte Fırat [99] 0.01 ve 0.10 mg/L cıva derişimlerinin etkisine bırakılan *O. niloticus*'ta 7 günlük süre sonunda solungaç ve karaciğer GR aktivitesinde azalış saptamış ve cıvanın toksik etkisinin bir sonucu olarak enzim aktivitesinin azaldığını belirtmiştir. Ayrıca kadmiyumun etkisinde *Australoheros facetus* türü balıklarda beyin GR aktivitesi de azalış göstermiştir [100].

GST hücrelerde detoksifikasyon süreçlerinde oldukça etkin ve önemli rolleri bulunan bir enzimdir [74]. Katalizlediği reaksiyon $ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$ şeklinde olup özellikle de lipit peroksitlerine karşı önemli antioksidan savunma hattı oluşturur. GST, GSH'ın ksenobiyotiklere konjugasyonunu da sağlayarak bu kimyasalların yapacağı zararlı etkilerden hücreleri ve bileşenlerini korumaktadır.

Sunulan araştırmada $CuSO_4$ ve $CuO-NP$ 'nin *O. niloticus*'ta GST aktivitesinde 4 günlük süre sonunda solungaç ve karaciğer dokularında artışlara bununla birlikte 21 günlük süre sonunda ise karaciğerde azalışlara neden olduğu belirlenmiştir. GST aktivitesindeki indüksiyonun $CuSO_4$ ve $CuO-NP$ 'nin toksik etkilerine karşı bir adaptasyon yanıtı olarak oluştuğu; bununla birlikte, inhibisyonun ise çalışmamızda da belirlendiği üzere bakırın etkisinde azalan hücre içi GSH düzeyleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Fırat ve Bozat [74] da TiO_2-NP 'nin *O. niloticus*'un solungaç dokusu GST aktivitesini arttırdığını ve TiO_2-NP 'nin toksisitesini nötralize etmek için hızlı bir adaptasyon yanıtı olarak GST aktivitesinin attığını rapor etmişlerdir. Keza Benavides ve ark. [48] da Al_2O_3 - ve $ZnO-NP$ 'nin etkisine farklı sürelerle bırakılan *C. auratus*'un solungaç ve karaciğer GST aktivitelerinde artışlar belirlemişlerdir. *C. carpio*'da $Ag-NP$ 'nin 4 günlük etkileşiminde dokuların GST enzim aktivitelerinde artışların olduğu ve GST indüksiyonunun nanopartiküllerin toksik etkilerinin önlenmesinde önemli roller oynadığı rapor edilmiştir [101].

GSH düşük moleküler ağırlıklı sülfidril grupları bakımından zengin bir molekül olup sahip oldukları $-SH$ gruplarıyla birçok toksik bileşiklere karşı koruyucu bir ajan ve H_2O_2 ve organik peroksitlerin indirgenme reaksiyonlarını katalizleyen GPX enziminin hidrojen donörü olarak görev yapmaktadır [102]. GSH'ın yapısında bulunan sistein rezidüsü bu tripeptidin, elektrofilik metabolitlerin ve metabolik olarak üretilen oksitleyici ajanların detoksifikasyonunda önemli roller oynamasını sağlayan nükleofilik bir tiyol özelliği kazanmasını sağlar [103]. Bu nedenle GSH'ın hüce içi düzeyleri ve bu düzeylerinin korunması hem normal hücre fonksiyonları hem de toksikant stresiyle mücadelede oldukça önemlidir.

Çalışmamızda *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer GSH düzeyleri hem $CuSO_4$ hem de $CuO-NP$ 'nin etkisinde 4 günlük sürenin sonunda artış 21 günlük süre sonunda ise azalış göstermiştir. GSH düzeylerindeki artışların her iki bakır formunun

hücrelerde yaptığı toksik etkilerinin nötralize edilmesinde önemli olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte sürenin uzamasıyla GSH düzeylerinde belirlenen azalışların bu molekülün sentezi üzerine bakırın toksik etkisinin yada bu molekülün oksidatif stres altında artan hücresel kullanımının bir sonucu olabilir. Çalışma sonuçlarımıza benzer şekilde Hao ve Chen [53], *C. carpio*'nun solungaç ve karaciğer dokuları GSH düzeyinin ZnO-NP'nin etkisinde 14 günlük süre sonunda 0.5 mg/L etkileşiminde arttığını; 5 ve 50 mg/L derişimlerin etkisinde ise azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar GSH düzeyindeki azalışların şiddetli oksidatif durumla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Dar ve ark. [104], aquatik kirleticilere karşı verilen savunma yanıtlarının ilk aşamalarında GSH düzeylerinin arttığını ifade etmişlerdir.

Başka çalışmalarda da GSH düzeylerinde önemli değişimler toksikantların etkisinde belirlenmiştir. Abdel-Khalek ve ark. [57], CuO ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un solungaçve karaciğer GSH düzeylerini azalttığını rapor etmişlerdir. ZnO ve ZnO-NP etkisinde de *D. rerio*'da karaciğer GSH düzeyleri azalış göstermiştir [94]. Fırat ve Kargın [105], 10 ve 20 günlük sürelerle 1.0 mg/L Cu etkileşimini takiben *C. carpio*'nun solungaç dokusu GSH düzeylerinin arttığını ve bu artışın bakırın solungaç dokusu üzerine toksik etkilerinin önlenmesinde kritik bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Keza Wang ve ark. [24] da 20 ve 100 µg/L Cu-NP etkisine 30 gün süreyle bırakılan *T. fasciatus* balıklarının karaciğer dokusu GSH düzeylerinde önemli artışlar saptamışlardır.

Ağır metaller ve metal bazlı nanopartiküllerin balıklarda lipid peroksidasyonuna yol açtığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu hücre zarlarının seçici geçirgenliğini bozmakta ve hücrelerde ciddi hasarlara yol açacak süreçleri başlatabilmektedir. Ağır metaller, pestisitler ve nano metaller gibi çevresel kirleticilerin aquatik organizmalarda neden olduğu oksidatif hasarın en önemli belirteçlerinden biri olarak lipid peroksidasyonu önerilmektedir. MDA lipid peroksidasyon ürünlerinden biri olup düzeylerindeki artışlar toksikantların oksidatif stresi ve bu stresin şiddeti hakkında kritik bilgiler sunmaktadır. MDA ROT'lar ile hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri arasındaki reaksiyonun bir ürünü olup radikallerin neden olduğu hücresel membran hasarının belirteçleri olarak atfedilmektedir [106].

Sunulan çalışmada *O. niloticus*'ta CuSO₄ ve CuO-NP'nin 21 günlük etki süresi sonunda solungaç ve karaciğer MDA düzeylerin önemli artışlara neden olduğu belirlenmiştir. MDA düzeyinin bakırın indüklediği ROT'lara bağlı olarak meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucunda arttığı düşünülmektedir. MDA düzeyindeki artışlar büyük bir olasılıkla bakırın balık dokularında oksidatif stresi indüklediğini göstermektedir. Hao ve Chen [53], metal oksit nanopartiküllerin toksik etkilerini araştırdıkları çalışmalarında da benzer sonuçlar bulmuşlardır. Araştırmacılar 5 ve 50 mg/L ZnO-NP etkisinde 10 ve 14 günlük süreler sonunda *C. carpio*'nun solungaç ve karaciğer dokusunda MDA düzeylerinin arttığını ve bunun oksidatif stresin bir belirteci olduğunu rapor etmişlerdir. Aytekin ve ark. [107] da 7 ve 14 günlük sürelerle 0.1 ve 1.0 mg/L metal karışımlarının (Cd+Cu+Cr+Pb+Zn) etkisine bırakılan *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer MDA düzeylerinde artışların ve bu artışların da metallerin yol açtığı lipid peroksidasyonun bir sonucu olduğunu belirtmişlerdir.

MDA düzeyinde artışlar metallerin ve metal bazlı nanopartiküllerin etkisinde birçok balık türünde gözlenmiştir. 8 gün süre ile Ag-NP'nin farklı derişimlerinin etkisine bırakılan *O. mossambicus*'un solungaç ve karaciğer dokularında MDA düzeyinin arttığı belirlenmiştir [52]. Shaw ve ark. [34], CuSO₄ ve Cu-NP'nin *O. mykiss*'in solungaç dokusunda lipid peroksidasyonun arttığını ve bunun da MDA gibi başka bir lipid peroksidasyon belirteci olan TBARS düzeylerinde artışlara neden olduğunu saptamışlardır. Başka çalışmada da CuO ve CuO-NP'nin etkisinde *O. niloticus*'un solungaç ve karaciğer MDA düzeyleri artış göstermiştir [57].

Genel olarak enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların, toksikantların indüklediği ROT üretimini durdurmak, oluşan ROT'ları temizlemek ve sonuç olarak da oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonu gibi hücrel hasarları engellemek gibi kritik rolleri bulunmaktadır. Bununla birlikte kirleticilerin toksik etkisi sonucu antioksidan savunma sistemindeki bir başarısızlık ya da yetersizlik hücreleri oksidatif stresin etkilerine açık ve savunmasız hale getirebilmektedir. Sunulan çalışmada CuSO₄ ve CuO-NP'nin *O. niloticus*'un dokularında oksidatif stresi indüklediği ve bunun sonucunda da lipid peroksidasyonun oluştuğu öngörülmektedir. Özellikle de 21 günlük süre sonunda dokularda azalan SOD, CAT, GR ve GST enzim aktivitesi ve GSH düzeylerine bağlı olarak MDA düzeylerinin arttığı düşünülmektedir. Hao ve

Chen [53] de *C. carpio*'da özellikle de yüksek ZnO-NP etkisinde solungaç ve karaciğer dokularında artan lipid peroksidasyon düzeylerinin azalan SOD, CAT, GPX aktivitesi ve GSH düzeylerine bağlı olarak oluşan antioksidan savunmadaki başarısızlıkla/yetersizlikle açıklanmışlardır.

Araştırma sonuçlarımızı dikkate aldığımızda *O. niloticus*'un hematolojik, plazma biyokimyasal ve oksidatif stres parametreleri üzerine CuSO₄ ve CuO-NP'nin benzer etkiler gösterdiği; bununla birlikte CuO-NP'nin toksik etkilerinin biraz daha fazla olduğu belirtilebilir. Shaw ve ark. [34] da *O. mykiss*'in hematolojik ve biyokimyasal parametreler üzerine Cu-NP'lerin genel olarak CuSO₄'e benzer toksik etkiler gösterdiğini vurgulanmışlardır. Abdel – Khalek ve ark. [56], *O. niloticus*'ta Zn-NP'nin Zn'ye oranla biraz daha toksik olduğunu belirtmişlerdir. *E. coioides* balıklarında da Cu-NP ve CuSO₄'ün genel olarak benzer toksik etkiler göstermesine rağmen Cu-NP'nin toksisitesinin CuSO₄'e göre biraz daha şiddetli olduğu rapor edilmiştir [60].

Sonuç olarak hem CuSO₄ hem de CuO-NP'nin *O. niloticus* için toksik olduğu ve incelenen hemen tüm parametrelerin bakırdan olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Her iki bakır formunun etkisinde genel olarak hematolojik parametrelerden eritrosit, hemoglobin ve hematokritte azalış, plazma biyokimyasal parametrelerinden ALT, AST, ALP, kortizol ve glukozda artış, oksidatif stres parametrelerinden ise SOD, CAT, GPX, GR, GST ve GSH'da azalış ile MDA'da ise artış belirlenmiştir. Sonuçlarımız bakırın *O. niloticus*'ta hematoksik olduğunu ve biyokimyasal ve oksidatif toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir. Bakırın her iki formu da balıkların dokularında oksidatif strese neden olmuştur. Ayrıca CuSO₄ ve CuO-NP'nin benzer toksisiteler göstermekle birlikte CuO-NP'nin toksik etkisinin biraz daha fazla olduğu söylenebilir. Araştırmamız balıklarda metallerin normal ya da nano boyutlu formlarının toksik etkilerini değerlendirmek için hematolojik, plazma biyokimyasal ve özellikle de oksidatif stres parametrelerinin biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini de göstermektedir.

KAYNAKLAR

- [1] D. Das, M. Moniruzzaman, A. Sarbajna ve S.B. Chakraborty, “Effect of heavy metals on tissue-specific antioxidant response in Indian major carps”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 24, pp. 18010–18024, 2017.
- [2] M.S. Islam ve M. Tanaka, “Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach of management: a review and synthesis”, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 48, no. 7, pp. 624–649, 2004.
- [3] P.L.R.M. Palaniappan ve V. Vijayasundaram, “The effect of arsenic exposure and the efficacy of DMSA on the proteins and lipids of the gill tissues of *Labeo rohita*”. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 47, no. 8, pp. 1752–1759, 2009.
- [4] A. Eroglu, Z. Dogan, E.G. Kanak, G. Atli ve M. Canli, “Effects of heavy metals (Cd, Cu, Cr, Pb, Zn) on fish glutathione metabolism”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, pp. 3229–3237, 2015.
- [5] A. Amr, R.B. Shereen ve S.M. Mohamed-Assem, “Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, pp. 1225–1236, 2016.
- [6] Y. Iger, R.A.C. Lock, H.A. Jenner ve Sew B, “Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper”, *Aquatic Toxicology*, vol. 29, pp. 49–64, 1994.
- [7] G. Nussey, J.H.J. Van Vuren ve H.H. Du Preez, “Effect of copper on the hematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae)”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 111C, pp. 369–380, 1995.
- [8] G. Isani, M.L. Falcioni, G. Barucca, D. Sekar, G. Andreani, E. Carpenè, G. Falcioni, “Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 97, pp. 40–46, 2013.
- [9] A.I. Alkobaby ve R.K. El-Wahed, “The acute toxicity of copper to Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings and its effects on gill and liver histology”, *Journal of Aquaculture Research & Development*, vol. 8, pp. 465–470, 2017.

- [10] S.J. Clearwater, A.M. Farag ve J.S. Meyer, "Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish", *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 132, pp. 269–276, 2002.
- [11] T. Gomes, J.P. Pinheiro, I. Cancio, C.G. Pereira, C. Cardoso ve M.J. Bebianno, "Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*", *Environmental Science & Technology*, vol. 45, no. 21, pp. 9356–9362, 2011.
- [12] S.J. Klaine, P.J.J. Alvarez, G.E. Batley, T.F. Fernandes, R.D. Handy, D.Y. Lyon, S. Mahendra, M. McLaughlin ve J.R. Lead, "Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects", *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 27, no. 9, pp. 1825–1851, 2008.
- [13] A. Nel, T. Xia, L. Mädler ve N. Li, "Toxic potential of materials at the nanolevel", *Science*, vol. 311, pp. 622–627, 2006.
- [14] R.D. Handy, T.B. Henry, T.M. Scown, B.D. Johnston ve C.R. Tyler, "Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish, a mechanistic analysis", *Ecotoxicology*, vol. 17, pp. 396–409, 2008.
- [16] A.M. Schrand, M.F. Rahman, S.M. Hussain, J.J. Schlager, D.A. Smith ve A.F. Syed, "Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment", *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, pp. 544–568, 2010.
- [17] P. Ünak, "Birden fazla görüntüleme sisteminde kullanılabilen görüntüleme problemleri (dual modalite problemleri)", *Nuclear Medicine Seminars*, vol. 5, pp. 15-22, 2019.
- [18] R.D. Handy, R. Owen ve E. Valsami-Jones, "The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs," *Ecotoxicology*, vol. 17, no. 5, pp. 315–325, 2008.
- [19] V. Matranga, I. Corsi, "Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches," *Marine Environmental Research*, vol. 76, pp. 32–40, 2012.
- [20] F. Gottschalk, T. Sonderer, R.W. Scholz ve B. Nowack, "Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for

- different regions,” *Environmental Science and Technology*, vol. 43, no. 24, pp. 9216–9222, 2009.
- [21] J.M. Exbrayat, E.N. Moudilou ve E. Lapied, “Harmful effects of nanoparticles on animals” *Journal of Nanotechnology*, vol. 22, pp. 1-10, 2015.
- [22] L. Kiaune ve N. Singhasemanon, “Pesticidal copper (I) oxide: environmental fate and aquatic toxicity”, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 213, pp. 1–26, 2011.
- [23] J. Gabbay ve G. Borkow, “Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities”, *Journal of Industrial Textiles*, vol. 35, pp. 323–335, 2006.
- [24] T. Wang, X. Wen, Y. Hu, X. Zhang, D. Wang ve S. Yin, “Copper nanoparticles induced oxidation stress, cell apoptosis and immune response in the liver of juvenile *Takifugu fasciatus*”, *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 84, pp. 648–655, 2019.
- [25] R.J. Griffith, K. Hyndman, N.D. Denslow ve D.S. Barber, “Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles”, *Toxicological Sciences*, vol. 107, pp. 404–415, 2009.
- [26] B.J. Shaw ve R. Handy, “Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions”, *Environment International*, vol. 37, pp. 1083–1097, 2011.
- [27] M. Farre, K.G. Schrantz, L. Kantiani ve D. Barceló, “Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 393, pp. 81–95, 2009.
- [28] C.P. Chio, W.Y. Chen, W.C. Chou, N.H. Hsieh, M.P. Ling ve C.M. Liao, “Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles”, *Science of the Total Environment*, vol. 420, pp. 111–118, 2012.
- [29] C. Ramsden, T. Smith, B. Shaw ve R. Handy, “Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain”, *Ecotoxicology*, vol. 18, pp. 939–951, 2009.

- [30] M. Grosell, J.C. McGeer ve C.M. Wood, “Plasma copper clearance and biliary copper excretion are stimulated in copper-acclimated trout”, *American Journal of Physiology-Regulatory*, vol. 280, pp. 796–806, 2001.
- [31] G. A. Al-Bairuty, B. J. Shaw, R. D. Handy ve T.B. Henry, “Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Aquatic Toxicology*, vol. 126, pp. 104–115, 2013.
- [32] D. Fernández, C.G. Gómez ve M. Babín, “*In vitro* evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells”, *Science of the Total Environment*, vol. 452, pp. 262–274, 2013.
- [33] J. Farkas, P. Christian, J.A.G. Urrea, N. Roos, M. Hassellöv, K.E. Tollefsen ve K.V. Thomas, “Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes”, *Aquatic Toxicology*, vol. 96, pp. 44–52, 2010.
- [34] B.J. Shaw, G. Al-Bairuty ve R.D. Handy, “Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation”, *Aquatic Toxicology*, vol. 116, pp. 90–101, 2012.
- [35] M. Bahmani, R. Kazemi ve P. Donskaya, “A comparative study of some hematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*)”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 4, no. 2, pp. 135–140, 2012.
- [36] M. Banaee, A. Mirvagefei, G. Rafei ve B.M. Amiri, “Effect of sub-lethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry”, *International Journal of Environmental Research*, vol. 2, no. 2, pp. 189–198, 2008.
- [37] Ö. Fırat ve F. Kargin, “Hematological parameters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sub-lethal concentrations of cadmium and zinc”, *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 24, pp. 1985-1989, 2015.
- [38] I.A.A. Mekkawy, U.M. Mahmoud ve R.H. Mohammed “Protective effects of tomato paste and vitamin E on atrazine-induced hematological and biochemical characteristics of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)”, *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology*, vol. 2, no. 1 pp. 11–21, 2013.

- [39] V. Sathya, M. Ramesh, R.K. Poopal ve B. Dinesh, “Acute and sub lethal effects in an Indian major carp *Cirrhinus mrigala* exposed to silver nitrate: gill Na^+/K^+ -ATPase, plasma electrolytes and biochemical alterations”, *Fish Shellfish Immunology*, vol. 32, no. 5, pp. 862–868, 2012.
- [40] M. Ramesh, M. Sankaran, V.V. Gowtham ve P.R. Krishnan “Hematological, biochemical and enzymological responses in an Indian major carp *Labeo rohita* induced by sublethal concentration of waterborne selenite exposure”, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 207, pp. 67–73, 2014.
- [41] M.J. Bebianno, F. G eret, P. Hoarau, M.A. Serafim, M.R. Coelho, M. G. Barelli ve M. Rom eo, “Biomarkers in *Ruditapes decussatus*: a potential bioindicator species”, *Biomarkers*, vol. 9, no. 4–5, pp. 305–330, 2004.
- [42] J. Prousek, “Fenton chemistry in biology and medicine”, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 79, pp. 2325–2338, 2007.
- [43] A. Doyotte, C. Cossu, M.C. Jacquin, M. Babut ve P. Vasseur, “Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*”, *Aquatic Toxicology*, vol. 39, pp. 93–110, 1997.
- [44] C.F. Howcroft, M.J.B. Amorim, C. Gravato, L. Guilhermino ve A.M.V.M. Soares, “Effects of natural and chemical stressors on *Enchytraeus albidus*: Can oxidative stress parameters be used as fast screening tools for the assessment of different stress impacts in soils?” *Environment International*, vol. 35, pp. 318–324, 2009.
- [45] K. Unfried, C. Albrecht, L. Klotz, A.V. Mikecz, S.G. Beck ve R.P.F. Schins, “Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms”, *Nanotoxicology*, vol. 1, no. 1, pp. 52–71, 2007.
- [46] H. Speisky, M. G omez, F. B. Bravo, C. L. Alarc on, C. Jullian, C. O. Azar, “Generation of superoxide radicals by copperglutathione complexes: redoxconsequences associated with their interaction with reduced glutathione”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 17, no. 5, pp. 1803–1810, 2009.

- [47] E.A. Khallaf, M. Galal ve M. Authman, “Assessment of heavy metals pollution and their effects on *Oreochromis niloticus* in aquatic drainage canals”, *Egyptian German Society of Zoology*, vol. 26, no. B, pp. 39–74, 1998.
- [48] M. Benavides, J. F. Lodeiro, P. Coelho, C. Lodeiro ve M.S. Diniz, “Single and combined effects of aluminum (Al₂O₃) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 23, pp. 24578–24591, 2016.
- [49] M.N. Moore, “Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment”, *Environment International*, vol. 32, no. 8, pp. 967–976, 2006.
- [50] Y. Chang, M. Zhang, L. Xia, J. Zhang ve G. Xing, “The toxic effects and mechanisms of CuO and ZnO nanoparticles”, *Materials*, vol. 5, pp. 2850-2871, 2012.
- [51] S. I. L. Gomes, S. C. Novais, C. Gravato, L. Guilhermino, J.J. Scott-Fordsmand, A. M. V. M. Soares ve M. J. B. Amorim, “Effect of Cu-nanoparticles versus one Cu-salt: Analysis of stress biomarkers response in *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta)”, *Nanotoxicology*, vol. 6, pp. 134-143, 2012.
- [52] R. Govindasamy ve A. A. Rahuman, “Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*)”, *Journal of Environmental Sciences*, vol. 24, pp. 1091–1098, 2012.
- [53] L. Hao ve L. Chen, “Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 80, pp. 103–110, 2012.
- [54] L.Q. Chen, B. Kang ve J. Ling, “Cytotoxicity of cuprous oxide nanoparticles to fish blood cells: hemolysis and internalization”, *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 15, pp. 1507-1515, 2013.
- [55] V. Vignesh, K.F. Anbarasi, S. Karthikeyeni, G. Sathiyarayanan, P. Subramanian ve R. Thirumurugan, “A superficial phyto-assisted synthesis of silver nanoparticles and their assessment on hematological and biochemical

- parameters in *Labeo rohita* (Hamilton, 1822)”, *Colloids and Surfaces A*, vol. 439, pp. 184–192, 2013.
- [56] A.A. Abdel-Khalek, M. Kadry, A. Hamed ve M.A. Marie, “Ecotoxicological impacts of zinc metal in comparison to its nanoparticles in Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*”, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, vol. 72, pp. 113–125, 2015.
- [57] A.A. Abdel-Khalek, M. A.M. Kadry, S. R. Badran ve M.A. Marie, “Comparative toxicity of copper oxide bulk and nano particles in Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus*: Biochemical and oxidative stress”, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, vol. 72, pp. 43–57, 2015.
- [58] M. Khabbazi, M. Harsij, S.A.A. Hedayati, H. Gholipoor, M.H. Gerami ve H.G. Farsani, “Effect of CuO nanoparticles on some hematological indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and their potential toxicity”, *Nanomedicine Journal*, vol. 2, pp. 67-73, 2015.
- [59] T. Wang, X. Long, Y. Cheng, Z. Liu ve S. Yan, “A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*: Growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology as biomarkers”, *International Journal of Genomics*, vol. 25, pp. 1-10, 2015.
- [60] T. Wang, X. Long, Z. Liu, Y. Cheng ve S. Yan, “Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile *Epinephelus coioides*”, *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 44, pp. 674-682, 2015.
- [61] A.A. Abdel-Khalek, S.R. Badran ve M.A.S. Marie, “Toxicity evaluation of copper oxide bulk and nanoparticles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using hematological, bioaccumulation and histological biomarkers”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 42, pp. 1225–1236, 2016.
- [62] M. Ates, V. Demir, Z. Arslan, H. Kayad, S. Yılmaz ve M. Camas, “Chronic exposure of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to iron oxide nanoparticles: Effects of particle morphology on accumulation, elimination, hematology and immune responses”, *Aquatic Toxicology*, vol. 177, pp. 22–32, 2016.

- [63] Y.R. Gupta, D.Sellegounder, M. Kannan, S. Deepa, B. Senthilkumaran ve Y. Basavaraju, “Effect of copper nanoparticles exposure in the physiology of the common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical, histological and proteomic approaches”, *Aquaculture and Fisheries*, vol. 1, pp. 15-23, 2016.
- [64] M. Tunçsoy, S. Duran, Ö. Ay, B. Cıçık ve C. Erdem, “Effects of copper oxide nanoparticles on antioxidant enzyme activities and on tissue accumulation of *Oreochromis niloticus*”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 99, pp. 360–364, 2017.
- [65] P. Akbary, S.S. Yarahmadi ve A. Jahanbakhshi, “Hematological, hepatic enzymes’ activity and oxidative stress responses of gray mullet (*Mugil cephalus*) after sub-acute exposure to copper oxide”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, pp. 1800–1808, 2018.
- [66] T. Ostaszewska, J. Śliwiński, M. Kamaszewski, P. Sysa ve M. Chojnacki, “Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 25, pp. 908–915, 2018.
- [67] S. Lartillot, P. Kadziora ve A. Athios, “Purification and characterization of new fungal catalase”, *Preparative Biochemistry*, vol. 18, no. 3, pp. 241–246, 1988.
- [68] Y. Sun, L.W. Oberley ve Y. Li, “A simple method for clinical assay of superoxide dismutase”, *Clinical Chemistry*, vol. 34, pp. 497–500, 1988.
- [69] E. Beutler, *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*. 2nd edition, New York: Grune and Staron, 1984.
- [70] W.H. Habig, M.J. Pabst ve W.B. Jakoby, “Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, pp. 7130–7139, 1974.
- [71] I. Carlberg ve B. Mannervik, “Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 250, pp. 5475–5480, 1975.
- [72] I.M. Dubovskiy, V.V. Martemyanov, Y.L. Vorontsova, M.J. Rantala, E.V. Gryzanova ve V.V. Glupov, “Effect of bacterial infection on antioxidant activity

- and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae)”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 148C, pp. 1–5, 2008.
- [73] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough ve A.L. Farr, “Protein measurements with the folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265–75, 1951.
- [74] Ö. Fırat ve R.C. Bozat, “Assessment of biochemical and toxic responses induced by titanium dioxide nanoparticles in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*”, *Human and Ecological Risk Assessment*, vol. 25, no. 6, pp. 1438–1447, 2019.
- [75] M. Cole, D. Arnold, B. Watten ve W. Krise, “Haematological and physiological responses of brook charr to untreated and limestone-neutralized acidmine drainage”, *Journal of Fish Biology*, vol. 59, pp. 79–91, 2001.
- [76] M.R. Narra, “Single and cartel effect of pesticides on biochemical and haematological status of *Clarias batrachus*: Along-term monitoring”, *Chemosphere*, vol. 144, pp. 966–974, 2016.
- [77] A.S.A. Harabawy ve I. Ata, “Sublethal toxicity of carbofuran pesticide on the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822): Hematological, biochemical and cytogenetic response”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 103, pp. 61–67, 2014.
- [78] B. Desai ve P. Parikh, “Biochemical alterations on exposure of imidacloprid and curzate on fresh water fish *Oreochromis mossambicus* and *Labeo rohita*”, *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, vol. 7, pp. 87-91, 2013.
- [79] S.A. Ibrahim ve S.A. Mahmoud, “Effect of heavy metals accumulation on enzyme activity and histology in liver of some Nile fish in Egypt”, *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, vol. 9, no. 1, pp. 203–219, 2005.
- [80] Ö. Fırat, H.Y. Cogun, T.A. Yüzereroğlu, G. Gök, Ö. Fırat, F. Kargin ve Y. Kötemen, “A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 37, pp. 657-666, 2011.
- [81] Ö. Fırat ve F. Kargin, “Individual and combined effects of heavy metals on serum biochemistry of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*”, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 58, pp. 151–157, 2010.

- [82] K.K. Saxena ve P. Gupta, “Impact of carbamates on glycogen contents in the muscles of freshwater fish *Channa punctatus*”, *Pollution Research*, vol. 24, pp. 669-670, 2005.
- [83] G.K. Iwama, M.M. Vijayan, R.B. Forsyth ve P.A. Ackerman, “Heat shock proteins and physiological in fish”, *American Zoologist*, vol. 39, pp. 901–909, 1999.
- [84] L. Murray, M.D. Rennie, E.C. Enders, K. Pleskach ve J.D. Martin, “Effect of nanosilver on cortisol release and morphometrics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 36, no. 6, pp. 1606–1613, 2017.
- [85] E.G. Canli, A. Dogan ve M. Canli,” Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al₂O₃, CuO, TiO₂) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 62, pp. 181-187, 2018.
- [86] C.B.R. Martinez, M.Y. Nage, C.T.B.V. Zaia ve D.A.M. Zaia, “Acute morphological and physiological effects of lead in the Neotropical fish, *Prochilodus lineatus*”, *Brazilian Journal of Biology*, vol. 64, pp. 797–807, 2004.
- [87] S.M. Monteiro, J.M. Mancera, A.F. Fernandes ve M. Sousa, “Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 141, pp. 375–383, 2005.
- [88] L. Liu, B. Zhu, Y.X. Gong, G.L. Liu ve G.X. Wang, “Neurotoxic effect of triazophos on goldfish (*Carassius auratus*) and tissue specific antioxidant responses”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 116, pp. 68–75, 2015.
- [89] M. Karaca, L. Varışlı, K. Korkmaz, O. Özeydin, F. Perçin ve H. Orhan, “Organochlorine pesticides and antioxidant enzymes are inversely correlated with liver enzyme gene expression in *Cyprinus carpio*”, *Toxicology Letters*, vol. 230, pp. 198–207, 2014.
- [90] J. Ma, C. Zhou, Y. Li. ve X. Li, “Biochemical responses to the toxicity of the biocide abamectin on the fresh water snail *Physa acuta*”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 101, pp. 31–35, 2014.

- [91] T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M.J. Scoullou ve A. Valavanidis, “Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece”, *Marine Pollution Bulletin*, vol. 54, pp. 1361–1371, 2007.
- [92] H. Linhua, W. Zhenyu ve X. Baoshan, “Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile Carp (*Cyprinus carpio*)”, *Journal of Environmental Sciences*, vol. 21, no. 10, pp. 1459–66, 2009.
- [93] J. Xia, H.Z. Zhou ve L.U. Hua, “ Effects of selected metal oxide nanoparticles on multiple biomarkers in *Carassius auratus*”, *Biomedical Environment Science*, vol. 26, pp. 742–749, 2013.
- [94] D. Xiong, T. Fang, L. Yu, X. Sima ve W. Zhu, “Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage”, *Science and Total Environment*, vol. 409, no. 8, pp.1444–1452, 2011.
- [95] M. Afifi, S. Saddick ve O.A.A. Zinada, “Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 23, no. 6, pp. 754–760, 2016.
- [96] R.V. Oost, R. Beyer ve J.N. Vermeulen, “Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 13, pp. 57–149, 2003.
- [97] A. Jos, S. Pichardo, A.I. Prieto, G. Repetto, C.M. Vazquez, I. Moreno ve A.M. Camean, “Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis sp.*) under laboratory conditions”, *Aquatic Toxicology*, vol. 72, pp. 261–271, 2005.
- [98] F.D. Villarreal, G.K. Das ve A. Abid, “ Sublethal effects of CuO nanoparticles on mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) are modulated by environmental salinity ”, *PLoS ONE*, vol. 9, pp. 88723. 2014.

- [99] Ö. Fırat “Civa, civa-selenyum ve civa-zeolit karışımlarına bırakılan *Oreochromis niloticus*’ta civanın, dokulardaki birikimi ve GSH ile ilişkili enzim aktivitelerine etkisi”, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi.
- [100] A.C. Crupkin ve M.L. Menone, “ Changes in the activities of glutathione-S-transferases, glutathione reductase and catalase after exposure to different concentrations of cadmium in *Australoheros facetus* (Cichlidae, Pisces)”, *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, vol. 8, pp. 21-25, 2013.
- [101] B. Lee, C.N. Duong ve J. Cho, “Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*) ”, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 34, pp. 1–14, 2012.
- [102] I. Moreno, S. Pichardo, L.G. Amores, A. Mate, C.M. Vazquez ve A.M. Camean, “Antioxidant enzyme activity and lipidperoxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally”, *Toxicon*, vol. 45, pp. 395–402, 2005.
- [103] R.S. Verma, A. Mehta ve N. Srivastava, “*In vivo* chlorpyrifos induced oxidative stress: Attenuation by antioxidant vitamins”, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 88, pp. 191–196, 2007.
- [104] S.A. Dar, A.R. Yousuf, M.H. Balkhi, F.A. Ganai ve F.A. Bhat, “Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.)”, *Chemosphere*, vol. 120, pp. 273–283, 2015.
- [105] Ö. Fırat ve F. Kargin, “Response of *Cyprinus carpio* to copper exposure: alterations in reduced glutathione, catalase and proteins electrophoretic patterns ”, *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 36, pp. 1021–1028, 2010.
- [106] X.Y. Li, S.H. Zeng, W.H. Zhang, L. Liu, S. Ma ve J.J. Wang, “Acute toxicity and superficial damage to goldfish from the ionic liquid 1-methyl-3-octylimidazolium bromide”, *Environmental Toxicology*, vol. 28, pp. 207–214, 2013.
- [107] T. Aytekin, O. Fırat, H.Y. Cogun, O. Fırat, D. Kargin, H. Karadag, G.Fridin ve F. Kargin, “Effects of metal mixtures (Cd+Cu+Cr+Pb+Zn) on antioxidant systems

and lipid peroxidation in tissues of freshwater fish, *Oreochromis niloticus*",
Fresenius Environmental Bulletin, vol. 26, no. 8 pp. 4963-496, 2017.

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Rabia EROL
Doğum Yeri : Adıyaman
Doğum Tarihi : 23.04.1985
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : rabiaerol0227@gmail.com

Eğitim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Fen Bilimleri ve Teknoloji Öğretmenliği	Amasya Üniversitesi	2010
Lise		Gaziantep Lisesi	2004

EKLER

Ek 1. Etik Kurul Kararı

**T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL
ETİK KURULU**

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
2	26.02.2018	Ç.Ü -SABİDAM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 1– Adıyaman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç.Dr.Özgür FIRAT'ın sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen 36 adet balık oreochromis niloticus'ta yapılması planlanan **“Bakır Sülfat ve Bakır Nanopartiküllerinin Oreochromis Niloticus'ta Hematoloji, Plazma Biyokimyası ve Doku Oksidatif Stres Durumları Üzerine Etkileri”** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN Prof. Dr . Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
Ç.Ü-SABİDAM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof .Dr.Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyostatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Hasan SOYLU
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]






KATILMADI



KATILMADI