

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARKLI DOZ VE SÜRELERDE LEVONORGESTREL
UYGULAMASININ ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*,
HAMILTON, 1822) ANTİOKSİDATİF METABOLİZMA ÜZERİNE
ETKİLERİ

Melek YAPICI

SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2023

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

FARKLI DOZ VE SÜRELERDE LEVONORGESTREL UYGULAMASININ ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822) ANTIOKSİDATİF METABOLİZMA ÜZERİNE ETKİLERİ

Melek YAPICI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İlknur MERİÇ TURGUT

Bu çalışmada, endokrin bozucu kimyasal olarak sınıflandırılan ve özellikle balıklarda üreme fizyolojisine etkileri bilinen, ancak yapılan son çalışmalarda metabolitlerinin ksenobiyotik gibi ekosistemde hareket ettiği, böylece antioksidan savunma mekanizmasına etkisi olduğu düşünülen sentetik progestinlerden biri olan Levonorgestrel (LNG)' in farklı doz ve sürelerde uygulanmasının, Zebra balıklarında (*Danio rerio*) antioksidatif metabolizma üzerine etkileri incelenmiştir. Deneme balıkları, LNG' nin düşük (0,312 µg/L) ve yüksek (6,24 µg/L) olmak üzere iki farklı dozuna 24, 48 ve 96 saat süre ile maruz bırakılmışlardır. Bu aşamada, akut biyodeneylemlerden statik deney yöntemi uygulanarak, deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Deneme planı uygulandıktan sonra balıklar disekte edilerek kas ve karaciğer doku örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerde antioksidan enzim aktivitesi ve lipid peroksidasyon düzeyi sırasıyla, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) analizleri ile ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada, enzim aktivite değerlerinin LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). Yüksek doz uygulamasının artan zamanla SOD enzim aktivite değeri üzerinde etkili olup, her iki doku açısından da değerlerde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. CAT enzim aktivite değerlerinin özellikle yüksek doz uygulanan gruptan elde edilen değerlerde değişkenlik gösterdiği, GPx enzim aktivite değerlerinin ise yüksek doz LNG uygulamasında, özellikle karaciğer dokusunda yüksek aktiviteye neden olduğu saptanmıştır. MDA değerlerine göre, karaciğer dokusunda düşük doz LNG uygulamasının, kas dokusu ile karşılaştırıldığında, azaldığı, yüksek dozda ise benzer değerlerin tespit edildiği, buna bağlı olarak karaciğer dokusunun kas dokusuna göre LNG uygulamasına daha duyarlı ve oksidatif stres için iyi bir indikatör olduğu tespit edilmiştir.

Temmuz 2023, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı, *Danio rerio*, Sentetik progestin, Levonorgestrel, Antioksidatif metabolizma

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE EFFECTS OF LEVONORGESTREL APPLICATION IN DIFFERENT
DOSE AND PERIODS ON ANTIOXIDATIVE METABOLISM OF ZEBRA
FISH (*Danio rerio*, HAMILTON, 1822)

Melek YAPICI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Fisheries and Aquaculture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İlknur MERİÇ TURGUT

In this study, the application of Levonorgestrel (LNG), one of the synthetic progestins classified as an endocrine disrupting chemical and known to have effects on reproductive physiology particularly in fish, nonetheless, whose metabolites are thought to act like xenobiotics in the ecosystem, in different doses and durations, on antioxidative metabolism in Zebra fish were investigated. Fish were exposed to two LNG as low (0.312 µg/L) and high (6.24 µg/L) doses for 24, 48 and 96 hours. At this stage, the static test method of acute bio-assay, was applied and the experiments were carried out in triplicate. Subsequently the experiment plan was performed, muscle and liver tissue samples were collected by dissecting the fish. In these samples, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation level were measured by SOD, CAT, GPx and MDA analysis, respectively. For this study, it was determined that enzyme activity values were affected by LNG dose administration, however the differences determined as a result of the statistical evaluation were found insignificant ($p \leq 0,05$). High-dose application had an effect on the SOD enzyme activity value with increasing application time and caused an acceleration in the values in terms of both tissues, CAT enzyme activity values fluctuated particularly the values obtained from the high-dose applied groups, and GPx enzyme activity values were observed in high-dose LNG application, demonstrated high activity especially in the liver. According to the results of the MDA, low-dose LNG application in liver tissue showed a decrease compared to muscle tissue, whereas similar values were determined at high doses. In this sense, liver tissue was found more sensitive to LNG application compared to muscle tissue and a better indicator for oxidative stress.

July 2023, 80 pages

Keywords: Zebra fish, *Danio rerio*, Synthetic progestin, Levonorgestrel, Antioxidative metabolism

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmamda beni yönlendiren ve her aşamasında değerli desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. İlknur MERİÇ TURGUT' a, çalışmalarım sırasında Su Kalitesi Laboratuvarı'nın tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan, her türlü destek ve yardım ile gelişmeme katkıda bulunan tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Akasya TOPÇU' ya, çalışmalarımda önemli katkıları bulunan ve beni yönlendiren tez izleme komitesi üyesi hocam Sayın Prof. Dr. Önder YILDIRIM' a, bölümün tüm imkanlarından faydalanmamı sağlayan, tez çalışmasının yürütüldüğü dönemde Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ' a, çalışmamın deneme aşamasının kurulması ve yürütülmesinde yardımcı olan, Akvaryum Uygulama İstasyonu (Üretim Odası-6)' nın tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Doç. Dr. Levent Doğankaya' ya, deneme balıklarının temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Aksu Akvaryum ve Pet Ürünleri Tic. Ltdi. Şti' ne, laboratuvar çalışmalarımda yardımcı olan Baran Medikal San. Tic. Ltd. Şti' ne, deneme örneklerinin muhafaza edilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Emre Keskin' e, su kalitesi ölçümü ve analizi çalışmalarımda bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Tolga Coşkun' a, deneme boyunca yanımda olan ve her zaman destek veren sevgili meslektaşım Damla SANCI' ya, verilerin istatistik olarak değerlendirilmesinde büyük bir özveri ile katkı sağlayan Sayın hocam Doç. Dr. Tülin OTBİÇER ACAR' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Öncelikli Alan Doktora Projesi kapsamında "21L0447001" proje numarası ve "Farklı Doz ve Sürelerde Levonorgestrel Uygulamasının Zebra Balıklarında (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) Antioksidatif Metabolizma Üzerine Etkileri" proje konusu ile desteklenmiştir.

Ayrıca çalışmalarım boyunca maddi ve manevi birçok fedakarlıklar göstererek beni her zaman desteklemiş olan canım annem ve babam Süheyla YAPICI, Türker YAPICI ve sevgili kardeşim Tolga YAPICI' ya en içten duygularla teşekkür ederim.

Melek YAPICI
Ankara, Temmuz

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Endokrin Bozucu Kimyasallar	4
2.2 Levonorgestrel	8
2.3 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	10
2.4 Antioksidan Savunma Sistemi	15
2.4.1 Antioksidanlar	16
2.4.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1).....	18
2.4.1.2 Katalaz (CAT; E.C.1.11.1.6)	19
2.4.1.3 Glutasyon peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9).....	21
2.5 Lipid Peroksidasyonu	22
2.5.1 Malondialdehit (MDA)	22
2.6 Sucul Canlılarda Gestajen Maruziyetine İlişkin Çalışmalar	23
2.6.1 LNG maruziyetine ilişkin çalışmalar	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	33
3.1 Materyal	33
3.1.1 Deneme alanı.....	33
3.1.2 Deneme materyali.....	33
3.1.3 Deneme ünitesi.....	34
3.1.4 Denemede kullanılan suya ilişkin özellikler.....	35
3.1.5 Denemede kullanılan sentetik progestine (levonorgestrel) ilişkin özellikler ve uygulama dozlarının belirlenmesi	37
3.1.6 Denemede kullanılan araç ve gereçler.....	38
3.2 Yöntem	40
3.2.1 Deneme süresi ve uygulama planı.....	40
3.2.1.1 Etik izin.....	40
3.2.2 Antioksidan enzim aktivitesine ilişkin analizler	41
3.2.2.1 Doku örneklerinin hazırlanması.....	41
3.2.2.2 Süperoksit dismutaz (SOD).....	42
3.2.2.3 Katalaz (CAT)	43
3.2.2.4 Glutasyon peroksidaz (GPx)	43
3.2.3 Lipid peroksidasyonuna ilişkin analizler.....	44

3.2.3.1 Malondialdehit (MDA)	44
3.2.4 İstatistik Değerlendirme	44
4. BULGULAR	45
4.1 Antioksidan Enzim Aktivitesine İlişkin Bulgular	45
4.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)	45
4.1.2 Katalaz (CAT)	49
4.1.3 Glutasyon peroksidaz (GPx).....	53
4.3 Lipid Peroksidasyonuna İlişkin Bulgular	57
4.3.1 Malondialdehit (MDA)	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	61
5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	61
5.2 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	62
5.3 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	63
5.4 Malondialdehit (MDA) Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi	63
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	79
EK 1 MDA konsantrasyon grafiği (nmol/L)	79
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

H_2O_2	Hidrojen Peroksit
$O_2^{\cdot -}$	Süperoksit
1O_2	Singlet Oksijen
$OH^{\cdot}$	Hidroksil Radikali
O_2	Oksijen
H_2O	Su
$4e^-$	Dört Elektron
ng/L	Nanogram/Litre
$^{\circ}C$	Santigrat Derece
g	Gram
cm	Santimetre
L	Litre
pH	Potansiyel Hidrojen (asit/alkali)
mm	Milimetre
$\mu g/L$	Mikrogram/Litre
dk	Dakika
nM	Nanomolar
μl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg/L	Miligram/Litre
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
mV	Milivolt
EU/ml	Endotoksin/Mililitre
nmol/g	Nanomol/Gram
μM	Mikromolar

Kısaltmalar

11-KT	11-Ketotestosteron
AB	Avrupa Birliği
AR	Androjen Reseptörü
BNF	β -naphthoflavone
BPA	Bisfenol A
CAT	Katalaz
Cu	Bakır
cyp19a1b	Beyin Aromatazı
$\dot{C}O_2$	Çözünmüş Oksijen
DDG	Dihidrogesteron
DES	Dietilstilbesterol

DRO	Drospirenonun
DOA	Dioktil Adipat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
E2	Östradiol
EE2	Etinilestradiol
E3	Östriol
EB	Endokrin Bozucu
EC	Elektrik İletkenliği
EBK	Endokrin Bozucu Kimyasal
ER	Östrojen Reseptörü
Fe	Demir
G6PDH	Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz
GES	Gestodenin
GnRH	Gonadotropin Salgılayan Hormon
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Redükte Glutasyon
GSI	Gonadosomatik İndeks
GSSG	Okside Glutasyon
GST	Glutasyon S-Transferaz
HPG	Hipotalamik-Hipofiz-Gonadal Eksen
IPCS	Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı
K _{0,05}	50µl Çözgen Madde İçeren
K ₁	1ml Çözgen Madde İçeren
L _D	Levonorgestrel Düşük Doz
L _{Da} -24	24 Saat Düşük Doz Uygulanan Grup
L _{Db} -48	48Saat Düşük Doz Uygulanan Grup
L _{Dc} -96	96 Saat Düşük Doz Uygulanan Grup
L _Y	Levonorgestrel Yüksek Doz
L _{Ya} -24	24 Saat Yüksek Doz Uygulanan Grup
L _{Yb} -48	48 Saat Yüksek Doz Uygulanan Grup
L _{Yc} -96	96 Saat Yüksek Doz Uygulanan Grup
LH	Lüteinize Edici Hormon
LNG	Levonorgestrel
MPA	Medroksiprogesteron Asetat
MR	Mineralokortikoid Reseptörü
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NGT	Norgestrel
NET	Norethisterone
NH ₃ -N	Amonyak
NO ₂ -N	Nitrit
NO ₃ -N	Nitrat

ORP	Oksidasyon İndirgeme Potansiyeli
P4	Progesteron Hormonu
PCZ	Propiconazole
PR	Progesteron Reseptörü
PSH	Protein Sülhidril
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
Se-GPx	Se-bağımlı Glutasyon Peroksidaz
SOD	Süperoksit Dismutaz
Zn	Çinko
UNEP	Birleşmiş Milletler Çevre Programı, Uluslararası Çalışma Örgütü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İntraselüler reseptörler ya da membran aracılı reseptörler ile hormon etkinleşmesi ve hücresel yollar şeması	8
Şekil 2.2 Levonorgestrel' in kimyasal formülü	9
Şekil 2.3 Organizmalardaki oksijen metabolizması ve ROT arasındaki dönüşüm	11
Şekil 2.4 Organizmalarda ROT seviyesinin dinamik yapısı	12
Şekil 2.5 Endojen kaynakların ROT üretimine etkisi	13
Şekil.2.6 Hücrenin antioksidan savunma mekanizması	17
Şekil 2.7 Antioksidanların Sınıflandırılması.....	18
Şekil 2.8 GPx ve GR' nin katalizlediği reaksiyon.....	22
Şekil 3.1 Deneme balıkları.....	34
Şekil 3.2 Deneme akvaryumları	35
Şekil 3.3 Deneme gruplarında su kalite parametrelerine ilişkin değerler	37
Şekil 3.4 Doku Örnekleri	42
Şekil 4.1 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri	46
Şekil 4.2 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri.....	48
Şekil 4.3 Deneme gruplarında kas dokusuna ait CAT analiz değerleri.....	50
Şekil 4.4 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ait CAT analiz değerleri	52
Şekil 4.5 Deneme gruplarında kas dokusuna ait GPx analiz değerleri	54
Şekil 4.6 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ait GPx analiz değerleri	56
Şekil 4.7 Deneme gruplarında kas dokusuna MDA analiz değerleri	58
Şekil 4.8 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna MDA analiz değerleri.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Deneme gruplarında su kalite parametrelerine ilişkin değerler	36
Çizelge 3.2 Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite ölçümü	42
Çizelge 3.3 Katalaz (CAT) enzim aktivite ölçümü	43
Çizelge 3.4 Glutasyon peroksidaz (GPx) enzim aktivite ölçümü	43
Çizelge 3.5 Malondialdehit (MDA/TBARS) değerinin ölçümü	44
Çizelge 4.1 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri	45
Çizelge 4.2 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri	47
Çizelge 4.3 Deneme gruplarında kas dokusuna ait CAT analiz değerleri	49
Çizelge 4.4 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ait CAT analiz değerleri	51
Çizelge 4.5 Deneme gruplarında kas dokusuna ait GPx analiz değerleri	53
Çizelge 4.6 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ait GPx analiz değerleri	55
Çizelge 4.7 Deneme gruplarında kas dokusuna MDA analiz değerleri	57
Çizelge 4.8 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna MDA analiz değerleri	59

1. GİRİŞ

Sürekli artan Dünya nüfusu, çarpık kentleşme, plansız ve bilinçsiz endüstrileşme, verimi artırmak amacı ile kullanılan tarım ilaçları, yapay gübreler ve deterjan gibi çeşitli kimyasal ajanlar çevreyi kirletmekte ve doğal yaşam için bir risk oluşturmaktadır. Sucul ekosisteme değişen konsantrasyonlarda (ng/L' den µg/L' ye kadar) giriş yapan doğal ve sentetik orijinli mikrokirleticiler, çoğunlukla antropojenik olup içerisinde endokrin bozucu kimyasallar (EBK) da bulunmaktadır (Rocha ve Rocha 2022).

EBK olarak da bilinen bazı maddeler (gestajenler, progestojenler veya progestinler) hücrel reseptörlerde düşük dozlarda bile hareket edecek şekilde tasarlanan hormonal ilaçların aktif maddeleridir. Bu kimyasallar ve metabolitleri, sucul ekosisteme insan ve hayvan kaynaklı doğal atıklar ile doğum kontrol ilacı olarak kullanılan tıbbi uygulamalar aracılığıyla ulaşmaktadır (Hoffmann *vd.*, 2012). Bunların arasında ekosistemi en çok etkileyenler ise steroid hormonlar olup (Fent, 2015), balık başta olmak üzere kabuklu su ürünleri veya sucul omurgasızlar gibi hedef dışı türleri tehdit etmektedir (Länge *vd.*, 2001; Pawlowski *vd.*, 2004; Sumpter ve Johnson, 2005; Jobling *vd.*, 2006; Caldwell *vd.*, 2008; Tyler ve Jobling, 2008; Besse ve Garric, 2009; Christen *vd.*, 2010).

Steroid hormonlardan olan progesteron ve progestinlerin (sentetik progestin/gestajen) büyük bir bölümü 1960 ve 1970' li yıllarda tasarlanmış olup, anti-gonadotropik özelliklere sahiptir. Balıklarda üreme üzerine olumsuz etkileri (Zeilinger *vd.*, 2009; Paulos *vd.*, 2010; Runnalls *vd.*, 2013) uzun zamandır süregelen çalışmalarla tespit edilmiştir. Hormon düzeylerinde değişikliğe (Runnalls *vd.*, 2013), ergin balık (Zucchi *vd.*, 2013, 2014) ve embriyolarda (Zucchi *vd.*, 2012) transkripsiyonel etkilere, cinsiyet gelişiminde değişikliğe (Liang *vd.*, 2015) ve dişi balıklarda erkek sekonder cinsiyet özelliklerinin uyarılmış gelişimi gibi etkilere sahip oldukları kanıtlanmıştır (Zeilinger *vd.*, 2009; Runnalls *vd.*, 2013). Ancak progestinlerin, sentetik östrojenik steroidler ile birlikte yoğun olarak kullanılmalarına rağmen ekotoksikolojik etkileri yeterince irdelenmemiştir (Fent, 2015).

"Gonanlar ve estranlar" olarak adlandırılan sentetik bir progestin olan Levonorgestrel (LNG), testosteron türevi olarak bilinmekte ve düşük konsantrasyonlarda dahi sucul organizmalar üzerinde negatif etkileri bulunmaktadır (Rocha ve Rocha 2022).

LNG, progesteron içeren hapların yanısıra kombine oral kontraseptiflerde bulunmakta veya hormon implantlarının içeriğini oluşturmaktadır. Ayrıca bu kimyasal, insanlarda ovulasyonu önleyerek servikal mukusun kalitesini bozmakta ve spermatozoanın girişini etkileyecek şekilde değiştirmektedir (Croxatto, 2002).

Sucul ortama antropojenik giriş yapan LNG' nin model organizma olan Zebra Balığı (*Danio rerio*)' nda etkileri ise cinsiyet farklılaşması, ergenliğin erkene çekilmesi, yumurtalık olgunlaşma süresi ve üreme başarısını olumsuz etkilemesi, olgun oosit sayısının azalması, sirkadiyen gen düzenlemesinin değişimi, karaciğer fonksiyonunun bozulması ve kuluçka sonrası hayatta kalma oranının düşmesi olarak bildirilmiştir (Rocha ve Rocha 2022).

LNG ve metabolitleri ekosistemde östrojenik bileşikler olarak hareket ederek aynı zamanda ksenöstrojenler ile sinerjik etki de göstererek serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir. Bu bağlamda, serbest radikaller ve/veya reaktif oksijen türleri (ROT) ile antioksidan sistem arasında oluşan dzensizliğin sonucu olarak oksidatif stres meydana gelmektedir. Oluşan bu oksidatif hasara karşı normal fizyolojik koşullarda hücreler antioksidan savunma sistemleri tarafından korunmaktadır. Bu noktada, antioksidan savunma sistemini oluşturan elemanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olmak üzere iki gruba ayrılır. Enzimatik olanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferaz (GST)' dir. Bu parametrelerin ölçüm ve takip edilmesi özellikle olası çevresel kirlilik düzeylerinin tespitinde ve organizmada getirdiği hasarın belirlenmesinde önem arz etmektedir (Yıldız, 2011).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar, gestajenlerin farklı sucul organizmalarda üreme fizyolojisi üzerindeki etkilerine primer olarak yoğunlaşmış olup, antioksidan savunma mekanizmasına odaklanan çalışmalar ise sadece bivalvia türleri ile yapılan az sayıda

Çalışma (Contardo-Jara vd., 2011) ile sınırlıdır ve balık üzerinde yürütülmüş herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Gestajenlerin bivalvia türlerinde antioksidan savunma sistemi üzerinde etkilerinin görülmesi, balıklar üzerindeki etkilerinin ne şekilde gelişebileceğine yönelik araştırma sorusunu ortaya çıkarmaktadır.

Bu bağlamda, bu tez çalışmasında, özellikle balıklarda üreme fizyolojisine etkileri bilinen, ancak yapılan son çalışmalarda metabolitlerinin ksenobiyotik gibi ekosistemde hareket ettiği, böylece antioksidan savunma mekanizmasına da etkisi olduğu düşünülen LNG' nin farklı doz ve sürelerde uygulanmasının Zebra balıklarında antioksidatif parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Endokrin Bozucu Kimyasallar

Ekosistemde canlılar arasındaki dengeyi bozan risk etmenleri incelendiğinde en önemli grubu EBK' ların oluşturduğu görülmektedir. EBK' lar olarak sınıflandırılan kimyasallar, pestisitleri, tüketici ürünleri ve endüstriyel uygulamalarda kullanılan birçok bileşik sınıfını, aynı zamanda farmasötikler ile doğal ve sentetik hormonları da kapsamaktadır. EBK' lar doğada doğal olarak bulunabildiği gibi (sarımsak, maydanoz, kahve gibi besinlerde bulunabilen fitoöstrojenler ancak çok fazla alındığında bu etkiyi gösterir) değişik sentetik ve endüstriyel ürünler (fungusit, herbisit, boya, plastik çözücüler gibi), evsel malzemeler (temizlik malzemeleri, parfüm gibi), ilaçlar (doğum kontrol hapları, dietilstilbestrol gibi) ve ağır metaller (arsenik, kadmiyum, uranyum, kurşun, civa gibi) içerisinde de yer alabilmektedir. AB' nin 2013 Kasım ayında yenilediği ve çeşitli araştırmalarda EB etkisi belirlenen 546 kimyasal için hazırladığı sınıflandırma sistemine göre, bu kimyasalların 147' sinin yüksek miktarda üretildiği, çevrede kalıcı olduğu ve Kategori 1 olarak sınıflandırılabilceği, 66'sının potansiyel tehlikeli olduğu, 60' ına ise insanların maruz kaldığı bildirilmektedir (Yurdakök Dikmen, 2017).

Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Birleşmiş Milletler Çevre Programı (UNEP) ve Uluslararası Çalışma Örgütü' nün (UNEP) 2002 yılında ortaklaşa düzenlediği Endokrin Bozucuların Bilimsel Olarak Global Belirlenmesi/Değerlendirilmesi" toplantısında endokrin bozucu kimyasal (EBK) tanımlaması "üreme, gelişme ve/veya davranışlardan sorumlu olan doğal hormonların sentez/üretim, salınım, taşınma, bağlanma, aktivite ve vücuttan atılmalarına etki eden ekzojen madde ve/veya madde karışımları" olarak yapılmıştır (Yurdakök Dikmen, 2017).

Birçok EBK, steroid hormonlar veya tiroid hormonları ile etkileşimde olup, protein ya da peptid yapıdaki hormonların sentez ve uyarılarını da etkileyebilirler (Aksan ve Özdemir, 2016).

Endokrin bozucular etkilerini, özellikle, östrojen, androjen, progesteron, tiroid hormonları, retinoid reseptörler üzerinden gösterir; bunların dışında, nükleer, nükleer olmayan steroid hormon, nonsteroid (aril hidrokarbon reseptörü), steroid sentezi ve/veya metabolizmasında yer alan enzimatik yollar ile endokrin-üreme sistemlerini oluşturan diğer mekanizmalar üzerinde de etkili olmaktadır. Çok düşük dozlarda bile reseptörlerin etkinleşmesi, hedef hücre reseptör seviyelerinin değiştirilmesi yoluyla doğrudan hedef bölgede aktive olabilmeleri (Darbre, 2015) ve non-monotonik doz-yanıt ilişkisi EBK için karakteristiktir. Non-monotonik etkilerini, reseptör yarışması, reseptör seçiciliği, reseptör down regülasyonu, farklı gen aktivasyonu ve yarışmacı mekanizmalar üzerinden yapabilir (Yurdakök Dikmen, 2017). EBK' lar histon deasetilazların inhibisyonuna ve protein kinazların indüksiyonuna da neden olabilirler (You *vd.*, 2001; Jansen *vd.*, 2004; Yıldız Fendoğlu *vd.*, 2019). Endojen hormonlar gibi çok düşük dozlarda biyolojik yanıt oluşturmaları. Bununla beraber, hormonların aksine kümülatif etki gösterdikleri için canlıda oluşturdıkları biyolojik yanıt çok daha etkili olabilmektedir.

EBK' lara maruz kalmanın epigenetik olarak da canlılara etki ettiği bilinmektedir. Canlının DNA yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmadan, genetik bilgide oluşan değişim ve bu etkinin maruz kalan birey veya nesilde değil, daha sonraki nesillerde de gözlenebilmesi "epigenetik etki" olarak tanımlanmaktadır, özellikle de EBK' lara maruz kalma sonucunda epigenomda değişiklikler meydana geldiği ifade edilmiştir (Bursch *vd.*, 1984). Yıldız Fendoğlu *vd.*, (2019) meydana gelen bu değişimlerin canlılarda gelişim geriliği, kanser (Diamanti-Kandarakis *vd.*, 2009, Swedenborg *vd.*, 2009) ve mental düzensizlikler gibi farklı hastalık türlerinde tetikleyici faktör olabileceğini bildirmiştir.

EBK' lar, dopaminerjik ve seratonerjik reseptörler ile sinir sistemine etki ederek, santral sinir sisteminin morfolojisini değiştirerek davranış kalıplarını da etkileyebilirler. Özellikle, kritik gelişimsel dönemlerde EBK' lara maruz kalmanın ciddi nörotoksik etkilerinin olabileceği öne sürülmektedir (Frye *vd.*, 2012). Ayrıca polikarbonat denilen sert, şeffaf plastik ve epoksi reçinede bulunan bir kimyasal olan Bisfenol A (BPA)' nın şizofreni ve diğer nörotoksik patolojilerle yakından ilişkisi olduğu, yenidoğanlarda,

bebeklerde ve çocuklarda da BPA maruziyeti sonucu nöronal, davranışsal ve bipolar bozukluklar olabileceği tespit edilmiştir (Brown *vd.*, 2009).

EBK' lar, sucul ekosisteme özellikle antropojenik faaliyetler (atık su arıtma tesisi suları, endüstriyel atıklar, evsel deşarj vb.) ve yağışlar ile giriş yapmaktadır (Carnevali *vd.*, 2018; He *vd.*, 2018). EBK' ların oluşturduğu kirlilik profili yalnızca sucul ekosistemi tehdit etmemekte, ayrıca tüm besin zincirini de etkileyerek su ürünleri üretim ve tüketim açısından oluşturduğu risk etmeni ile insan sağlığına büyük zararlar oluşturmaktadır. Bu konuda, EBK kapsamına giren farklı kirleticiler üzerine yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır (Kazeto *vd.*, 2004; Caballero-Gallardo *vd.*, 2016). Su ortamında bu kirleticilerden olan hormonların varlığı, özellikle hedef dışı farklı sucul canlılarda (balık, çift kabuklu, gastropod vb.), gonadal anomaliler, üreme yetersizliği, vitellojen indüksiyonu, doğurganlığın azalması ve interseks bireylerin gelişimi gibi olumsuz etkilere neden olmakta (Czarny *vd.*, 2019) ayrıca, popülasyonda da azalma görülmektedir (Horiguchi, 2006).

Ekosistemi en çok etkileyen ve en güçlü EBK' lardan olduğu bilinen steroid hormonlar, günümüzde dünya çapında 100 milyonun üzerinde kadın tarafından kullanılan hormonal ilaçlar ile çevresel ortama giriş yapmaktadır (Hoffmann *vd.*, 2012). Bu doğurganlık ve doğum kontrol yöntemlerinde tercih edilen hormonal ilaçların, kullanımının cinsel özgürlük kültürünün gelişmesiyle her yıl küresel olarak arttığı bilinmekte (Stanczyk *vd.*, 2013) ve bu ilaç pazarının 2015 yılında 42,1 milyar dolar iken 2025 yılında 64 milyar dolar gibi bir rakama ulaşması beklenmektedir (Kaur *vd.*, 2021).

Aynı diğer EBK' larda olduğu gibi hormonal ilaçlar da idrar ve dışkı yoluyla glukuronidler ve sülfatlarla konjuge olabilen hidroksillenmiş ve metillenmiş metabolitler olarak atılmakta (Lai *vd.*, 2000; Junior *vd.*, 2010; Brito *vd.*, 2010) ve evsel atık sulara karışmaktadır. Bu ilaçlar, kanalizasyon arıtma tesisleri tarafından tamamen ortadan kaldırılamadığından (Zheng *vd.*, 2008) yüzey sularının yanı sıra yeraltı sularının da kirlenmesine yol açmaktadır.

Yukarıda ekolojik ortama giriş yolları ve çevresel etkilerinden bahsedilen steroid hormonlar, gen transkripsiyonu ve hücre fonksiyonunda değişimler gibi fizyolojik

etkilerini steroid hormon reseptörlerine bağlanarak göstermekte (Anonim, 2023) ve hedef hücreye ulaştıklarında ayrılarak difüzyonla hücre içine girmektedirler. Bazıları ise sitoplazmada reseptör ile birleşmeden çekirdekte gen etkileşimi ve kromatindeki DNA' dan yeni mRNA oluşumunu başlatmaktadırlar (Anonim, 2017).

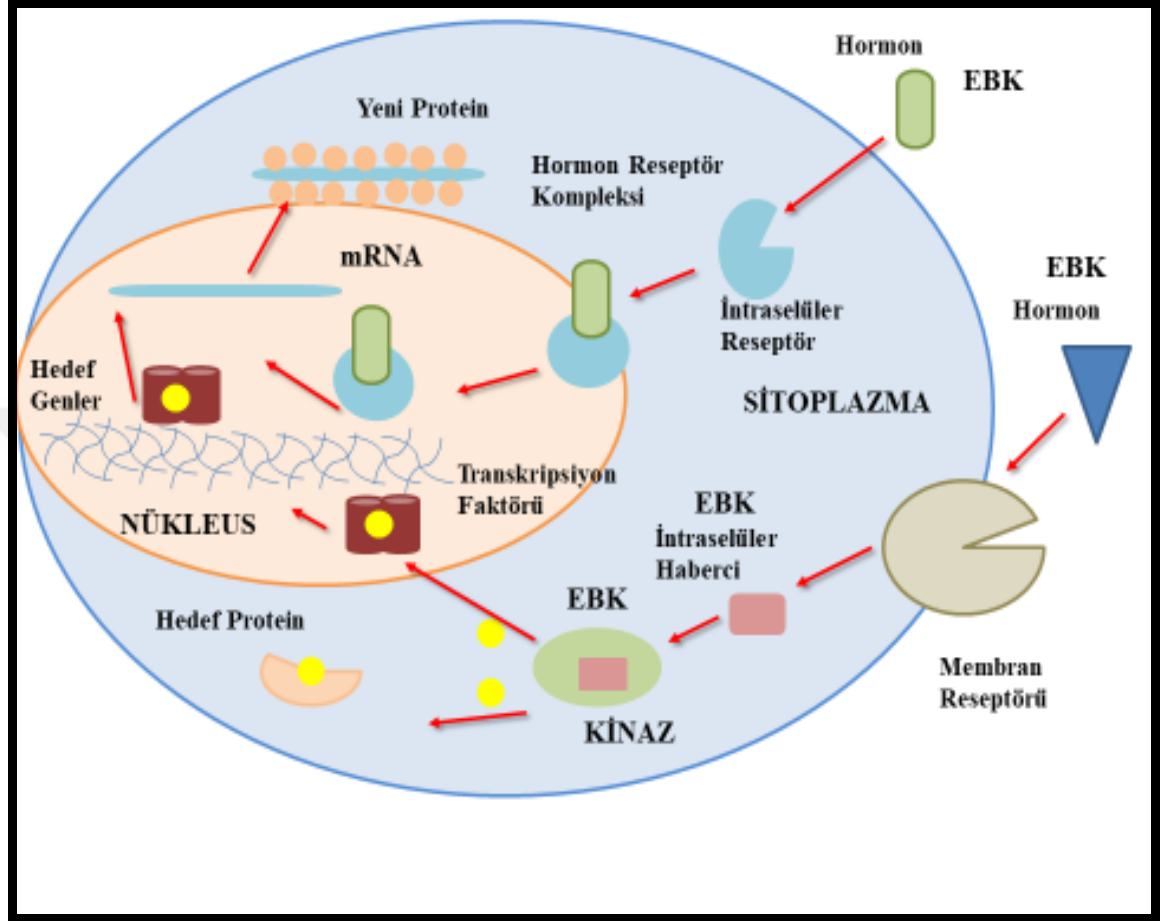
Ovaryum, testis ve adrenal korteks gibi dokulardan kolestrol bileşiğinden sentezlenen steroid hormonlar (Anonim, 2021), hücrede önce pregnenolona sonra da 21 karbona sahip yağda çözünen progesterona dönüştürülür (Anonim, 2017) ve sürrenal korteks steroid hormonların sentezinde ara üründür.

Pregnenolonun progesterona dönüşme yolağı, bir dehidrojenaz etkisiyle progesterona veya spesifik bir 17-hidroksilaz etkisiyle 17-hidroksipregnenolona çevrilmesi şeklindedir. Progesteron ve 17-hidroksipregnenolon, spesifik oksijenazlar ve dehidrojenazlar tarafından çeşitli aktif hormonlara dönüşürler (Anonim, 2017). Progesteron globüline bağlanarak kanda taşınır. Progesteron ve metabolitlerinin yaklaşık %75' i, safra ile bağırsaklara iletilerek dışkıyla atılır. Progesteronun ana metaboliti pregnanediol olup idrarla dışarı atılır. Hedef hücrelerde sitozolik spesifik bir bağlayıcı proteine bağlanarak oluşan hormon-reseptör kompleksi, nükleusa taşınır ve kromatinle etkileşerek RNA sentezini etkiler ve böylece hormonal aktivite gösterir (Anonim, 2017). Progesteron, östrojen hormonu ile birlikte sekonder cinsiyet karakterlerinin meydana gelmesinde önemlidir.

Progesteron hormon etkisi gösteren kimyasal maddelere "gestajen" denir. Progestojen, gestajen ya da progestin gibi isimler ile kullanılmakla beraber en yaygın kullanılan ifade "progestin" dir. Doğal progesteron hormonu organizmada çok hızlı inaktive olduğundan, çeşitli sentetik progestinler geliştirilmiştir. Progesteron ve sentetik progestinler, esas olarak progesteron reseptörü (PR) olmak üzere, androjen reseptörü (AR), östrojen reseptörü (ER), glukokortikoid reseptörü (GR) ve mineralokortikoid reseptörü (MR) gibi reseptörler aracılığıyla etki ederler (Fent, 2015).

Sentetik progestinler, östrojenik, antiandrojenik ve androjenik olarak çeşitli hormonal aktivitelere sahip olabilirler. Ayrıca, pek çok oral kontraseptif (sentetik bir östrojen ve

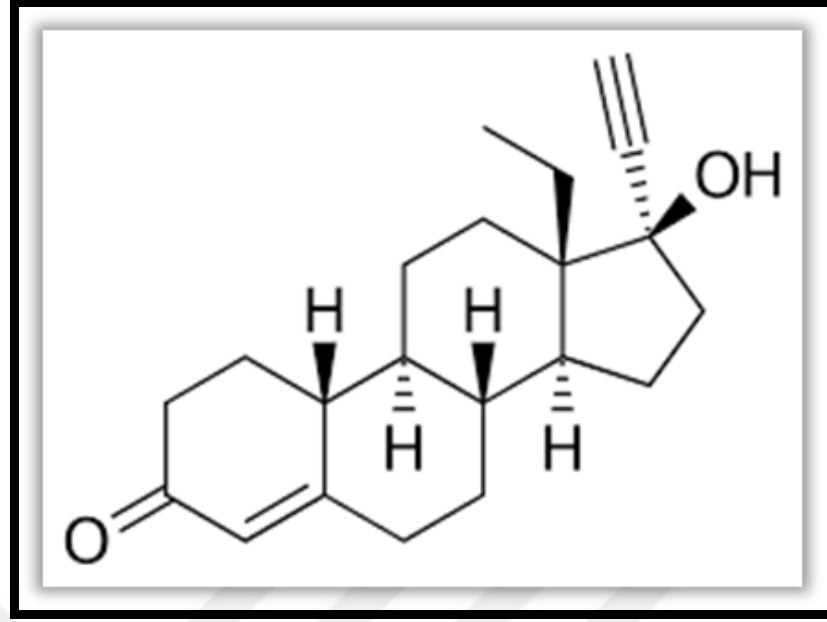
bir progestin karışımıdır) ve hormon tedavisi ilaçlarının da bir parçasıdır (Hoffmann vd., 2012) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 İntraselüler reseptörler ya da membran aracılı reseptörler ile hormon etkinleşmesi ve hücresel yollar şeması (Yurdakök Dikmen, 2017)

2.2 Levonorgestrel

Levonorgestrel (LNG), progestojen içeren hapların yanı sıra kombine oral kontraseptiflerin veya hormon implantlarının oluşturduğu progestinlerden biridir ve steroid çekirdek yapısına sahip (Durand, 2001) farmasötik bir moleküldür (Narvaez vd., 2019) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Levonorgestrel' in kimyasal formülü (Anonim, 2020)

Progesteronun ana biyolojik hedefi olan progesteron reseptörünün bir agonisti olan LNG, aynı zamanda, androjen bir hormon olan testosteronunun ana biyolojik hedefi olan androjen reseptörünün de zayıf bir agonistidir. Östrojenik, glukokortikoid veya antimineralokortikoid aktivitesi dışında önemli hormonal aktivitesi yoktur. Progestojenik aktivitesi nedeniyle antigonadotropik etkileri bulunmakta ve her iki cinsiyette de gonadal seks hormonu üretimini ve doğurganlığı baskılayabilmektedir. Erkeklerde, antigonadotropik etkilerine ek olarak dolaşımdaki testosteron düzeyinin belirgin şekilde baskılanmasına neden olmaktadır (Anonim, 2020).

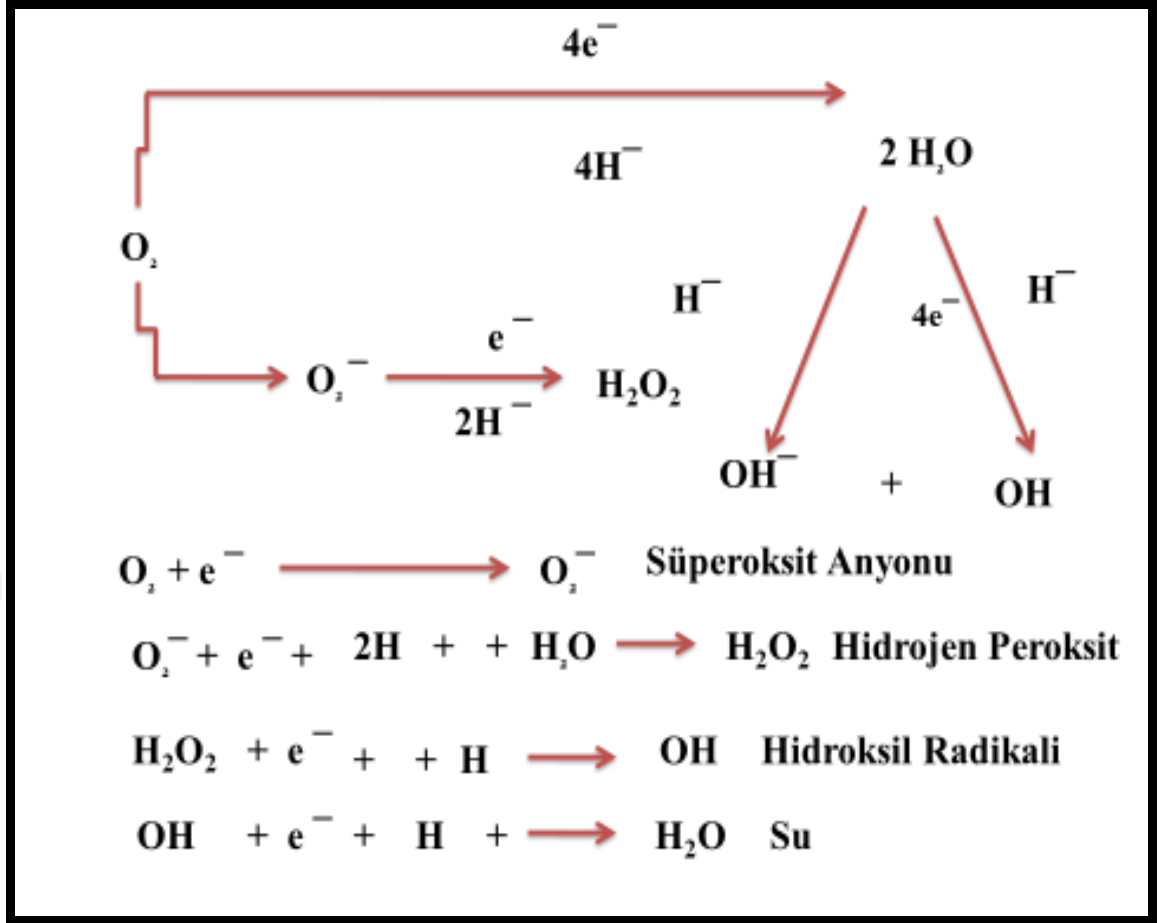
LNG' nin eliminasyon yarılanma ömrü 24 ile 32 saattir, ancak 8 saat kadar kısa ve 45 saat kadar uzun değerler de bildirilmiştir. Tek bir oral LNG dozunun yaklaşık % 20 - 67' si idrar ile % 21 - 34' ü ise dışkı yoluyla atılmakta (Besse *vd.*, 2009; De Alda ve Barcelo, 2000; Torreilles *vd.*, 2009) ve sucul ekosisteme bu şekilde girmektedir. Burada oldukça aktif olan LNG, balık gibi hedef dışı organizmaların endokrin sistemine etki etmekte (Christen *vd.*, 2010; Lorenz *vd.*, 2011) ve üreme biyolojisini olumsuz yönde etkilemektedir (Kvarnryd *vd.*, 2011; Lorenz *vd.*, 2011; Yager, 1992).

2.3 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Canlılarda, kimyasal süreçler (endojen ve eksojen faktörlerin etkisi altında) özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Hücrelerde diğer moleküllerle reaksiyona girerek onlara zarar verebilen elektrik yüklü, dengesiz moleküllere "serbest radikaller" adı verilmektedir. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir, böylece hücrelere ve canlıya zarar verebilir (Anonim, 2009). Serbest radikaller zarar verdikleri moleküllerin serbest radikallere dönüştüğü zincir reaksiyonları da oluşturabilirler.

Serbest radikallerin kaynağını moleküler oksijen oluşturmaktadır. Organizmada demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn) gibi metalleri içeren enzimler aracılığıyla oksitlenme reaksiyonları gerçekleşmektedir. Oksijenden türeyen radikaller, canlı sistemlerde normal metabolik reaksiyonlar ya da eksojen faktörler ile oluşan radikal türlerin en önemli sınıfıdır ve reaktif oksijen türleri (ROT) olarak adlandırılmaktadır. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit (O_2^-), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) gibi serbest radikal olmayan bu oksijen türleri canlı metabolizmasında toksik etkilere sebep olabilmektedir (Aslankoç vd., 2019).

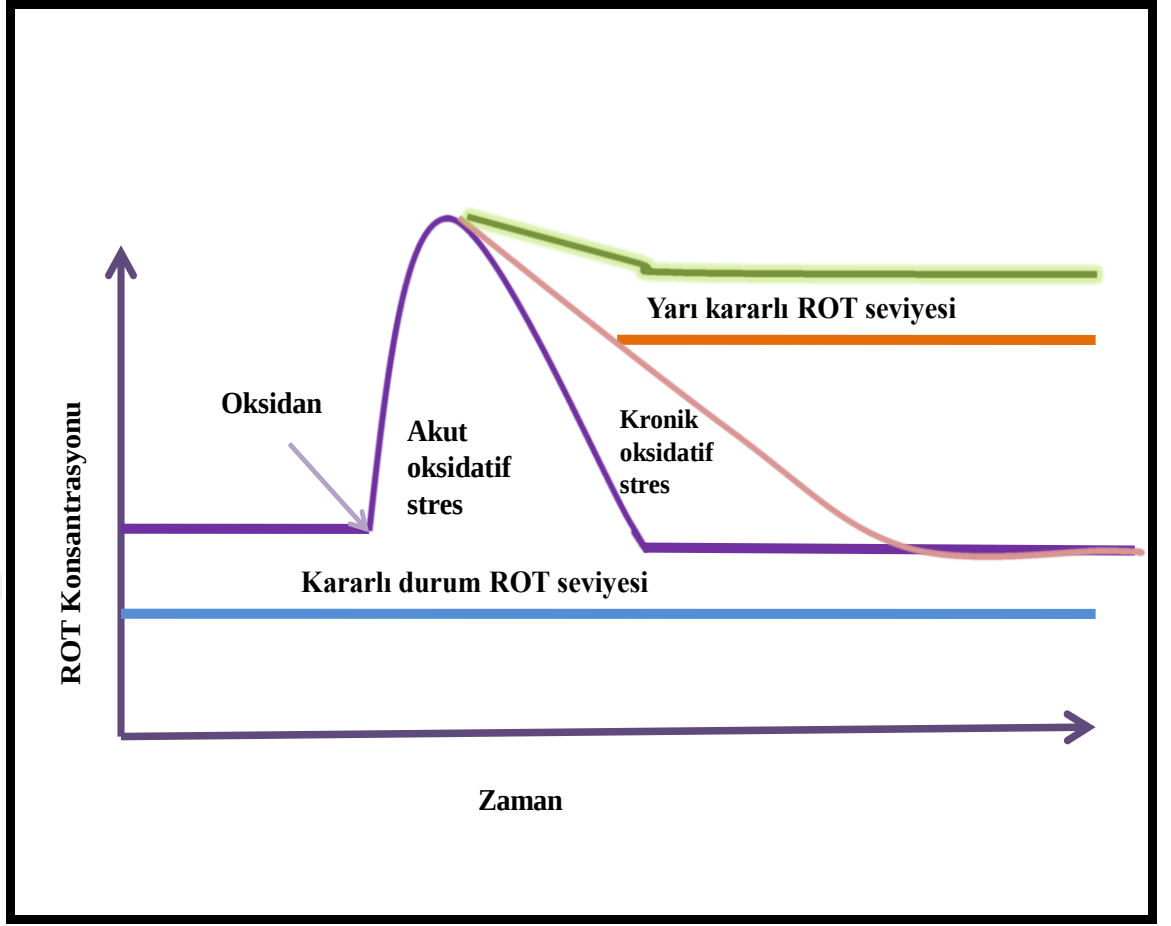
Serbest radikallerdeki eşleşmemiş elektronlar, çoğunlukla kimyasal reaksiyonlara giren reaktif radikallerdir. Bazı ROT' lar, genellikle 1O_2 , O_2^- , H_2O_2 , OH^- gibi moleküllerle karıştırılır. Örneğin; 1O_2 eşleşmemiş oksijen içermediği için serbest radikal değildir. Ancak, oksijenin yüksek reaktif bir formudur ve bu nedenle oksijenden daha hızlı bir biyolojik moleküldür. H_2O_2 ise radikal olmamasına rağmen, oksijenden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu için reaktif türdür (Akbulut vd., 2014) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Organizmalardaki oksijen metabolizması ve ROT arasındaki dönüşüm (Akbulut vd., 2014).

Moleküler oksijenin (O_2) kısmi olarak indirgenmesi sonucu oluşan ürünler ROT' u oluşturmaktadır. O_2 genellikle, dört elektron ($4e^-$) mekanizması ile indirgendiğinde su molekülü (H_2O) ortaya çıkmaktadır. Bu işlem, mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından gerçekleştirilir. Eğer tek bir elektron O_2 ' ye sıralı eklenirse bu durumda süperoksit anyonu oluşur. Bunun yanında, H_2O_2 , OH^- ne ve OH a indirgenir. OH ya elektron ve proton eklenmesi sonucunda oluşan H_2O ile zincir tamamlanır (Akbulut vd., 2014).

ROT, çeşitli antioksidanlarla detoksifiye edilebilmekte veya hücre içi/dışı komponentlerle etkileşebilmektedir. Bu sebeple hücre kontrolünde olup hücre içi konsantrasyonları genellikle 10^{-8} moları geçmez (Foyer ve Noctor, 2009; Akbulut vd., 2014) (Şekil 2.4).



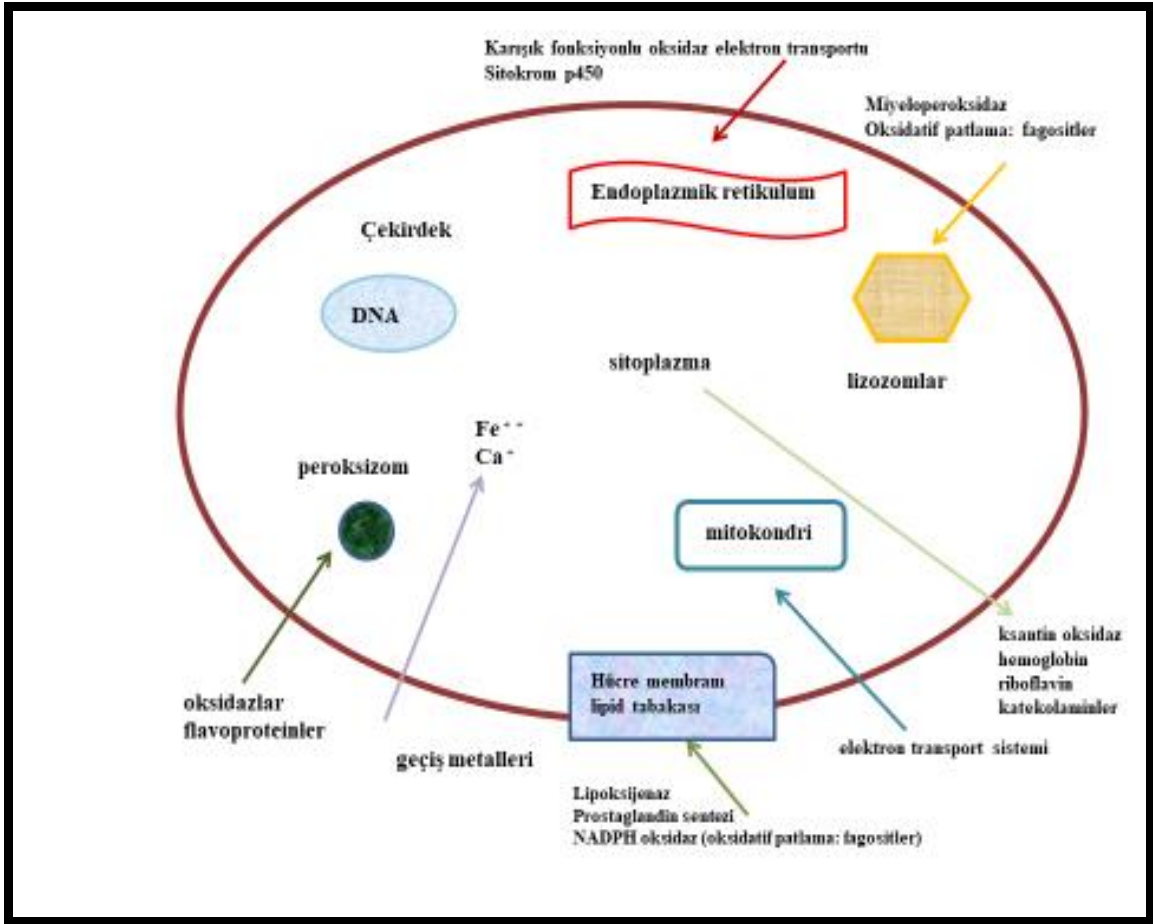
Şekil 2.4 Organizmalarda ROS seviyesinin dinamik yapısı (Lushchak, 2011).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (O_2^- , OH^- ve H_2O_2) veya diğer serbest radikaller ile antioksidan sistem arasında oluşan dengesizliktir ve bu dengesizlik hücrenin önemli kısımlarında geri dönüşümsüz hasarlara neden olur. Meydana gelen oksidatif hasar, kararlı durumdaki ROS seviyesini artırır ve antioksidan potansiyeli yeterli ise, ROS düzeyindeki geçici artış "akut oksidatif stres" olarak isimlendirilir. Antioksidan sistemin dengede olmadığı zaman ise hızlı bir şekilde ROS üretilir ve sistemde "kronik oksidatif stres" oluşur (Akbulut, 2014).

Biyolojik sistemlerde, ROS üretimi çoğunlukla oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak üretilse de aslında birçok mekanizması bulunmaktadır. Canlıların kullandığı oksijenin %90' ından fazlası enerji üretimiyle ilgili elektron transportunun $4e^-$ mekanizması ile kullanılmaktadır (Papa ve Skulachev, 1997). Elektronların moleküler

oksijen ile etkileşime girerek süper oksit anyonunun oluşturduğu mitokondriyal elektron taşıma zincirinin en önemli bileşenleri Koenzim Q ve kompleks III' dür (Demin vd., 1998). Endoplazmik retikulumdaki elektron taşıma zinciri ROT' un en önemli ikinci kaynağıdır (Malhotra ve Kaufman, 2007).

Ağır metaller, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, poliklorlubifeniller, dioksinler ve benzer formülasyonlu çevresel kirleticiler ROT' nin ana grubunu oluşturan kirleticilerdir (Lushchak, 2008; Alak vd., 2013). ROT üretiminin moleküler mekanizması, NADPH' ın enzimatik oksidasyonuna bağlıdır. Bu sistem mikroorganizmaları hedef alarak ROT seviyesini hücresel düzeyde kontrol eder (Akbulut vd., 2014) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Endojen kaynakların ROT üretimine etkisi (Akbulut vd., 2014).

Çevresel kirleticilerden olan herbisitlerin bazı balık türlerinin doku ve organlarında ROT üretimini artırarak oksidatif stres geliştirme potansiyeli olduğu aşağıda detayları verilen bazı çalışmalar ile kanıtlanmıştır.

Hibrid Amazon balığında (*Pseudoplatystoma sp.*) glifosat herbisitinin 15 mg/L dozunun 96 saat süreyle uygulandığı bir akut çalışmada balıklarda oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmasına ilişkin parametreler değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, balıkların karaciğer ve beyin dokularında antioksidan aktivitenin arttığını, karaciğer ve kas dokularında ise TBARS seviyelerinin yükseldiğini tespit etmişlerdir (Sinhorin vd., 2014).

Yaygın bir herbisit olan Diquat' ın, 2000 yılında Wright ve arkadaşları tarafından sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarının karaciğer hücrelerinde ve 2006 yılında Hook ve arkadaşları tarafından gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) solungaç dokularında ROT üretimini uyardığı, tespit edilmiştir.

Atrazinin, *Prochilodus lineatus* türünde akut etkisinin belirlendiği bir çalışmada ise farklı hücre tiplerinde herbisit antioksidan enzimleri inhibe ettiği gözlenmiştir (Santos ve Martinez, 2012).

Ayrıca, Avrupa yılan balığı (*Anguilla anguilla*)' nın bir kemopreventif ajan olan β -naphthoflavone (BNF)' ın 2,7 μ M dozuna 24 saat maruz bırakılması sonucunda solungaç ve böbrek dokularında oksidatif stresin oldukça arttığı ifade edilmiştir (Ahmad vd., 2006).

Üreten ve İşisag Üçüncü' nün 2013 yılında yaptığı çalışmada, Dioktil adipatın (DOA) çipura (*Sparus aurata*) balıklarının karaciğer ve solungaç dokuları üzerine olan etkileri incelenmiştir. Balıklar DOA ile 250, 500 ve 750 ppm dozlarında 15 gün süreyle muamele edilmiştir. Buna bağlı olarak, dokularda artan kimyasal konsantrasyon ile birlikte bir dizi hepatosellüler değişimle, çoklu histolojik değişimler rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada ise, *Goodea gracilis* türü balıklar 96 saat boyunca 0,01; 0,1; 1; 10; ve 100 mg/L olmak üzere beş farklı Halometan (klorun azotlu bileşikler ile oluşturduğu kimyasal) dozuna maruz bırakılmışlardır. Artan doza bağlı olarak ROT üretiminin arttığı ve oksidatif stres olduğu gözlenmiştir (Dzul-Caamal vd., 2013).

Arsenik trioksitin 50 µg/L dozda 90 gün boyunca uygulanmasının zebra balığının (*Danio rerio*) beyin dokusunda ROT üretimini artırarak oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir (Sarkar vd., 2014).

Sepici ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada, Cyfluthrin sazan embriyolarına 10 µg/L (subletal doz) olarak 48 gün süreyle uygulanmış ve balıkların beyin dokularında MDA düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir.

Kızılöz balığı (*Rutilus rutilus*) ile yapılan bir araştırmada, diazonin maddesi 24, 48 ve 96 saatlik sürelerle ve 20, 40 ve 60 µg/L olmak üzere 3 farklı dozda balıklara uygulanmıştır. Yapılan çalışmada, 24 saatin sonunda CAT aktivite değerlerinin arttığı, 48 ve 96 saatlerde ise değerlerin azaldığı gözlenmiştir (Keramati vd., 2010).

2.4 Antioksidan Savunma Sistemi

Sucul canlılarda yaşadıkları ortamda bulunan pek çok farklı değişkene (su sıcaklığı, çözülmüş oksijen, kimyasal maddelere maruziyet, predatör varlığı vb.) bağlı olarak ortaya çıkan stres, metabolik aktiviteler üzerinde kendini göstermeye başladığında fizyolojik olarak hücrelerde birçok biyokimyasal değişikliğe neden olmaktadır. Tüm bu süreç canlı metabolizmasında geri dönüşümü olan veya olmayan hasarlar bırakarak canlının birçok hayati fonksiyonunu (büyüme, solunum, gelişim, üreme gibi) sınırlamaktadır. Bunun yanında homeostatik dengenin bozulmasına neden olabilmekte ve bu dengenin tekrar kurulamaması sonucu ölümler meydana getirmektedir (Morales vd., 2004; Tuna-Keleştemur ve Özdemir, 2011). Bu tip kararsız ortam koşullarına karşı canlının yeniden homeostasisini sağlayabilmesi ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırabilmesi için canlılarda antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir (Cheeseman ve Slater, 1993, Isbir, 1994). Normal fizyolojik koşullarda hücreler,

oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur (Rice-Evans *vd.*, 1997).

Antioksidan savunma sistemi aşağıda belirtildiği üzere beş farklı şekilde görevini yerine getirmektedir:

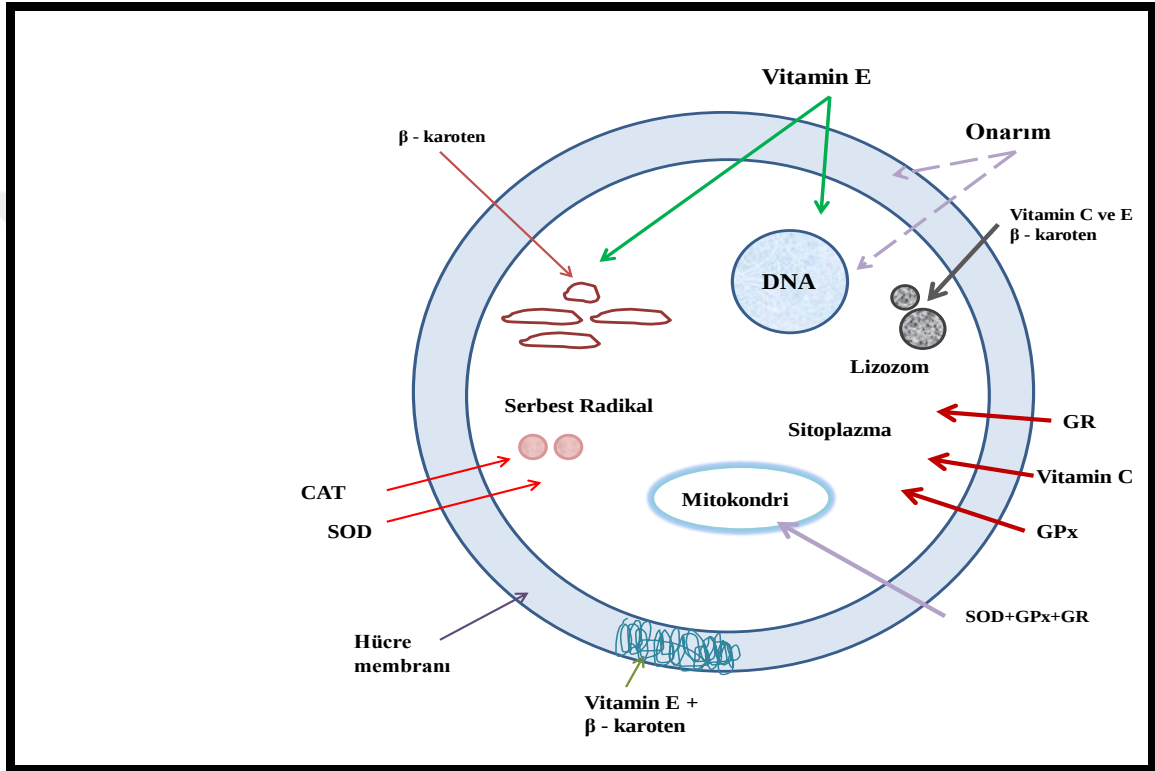
- Radikal metabolit üretiminin önlenmesi,
- Üretilmiş radikallerin temizlenmesi,
- Oluşan hücre deformasyonunun onarılması,
- Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve
- Endojen antioksidan kapasitenin artırılması (Akkuş, 1995).

2.4.1 Antioksidanlar

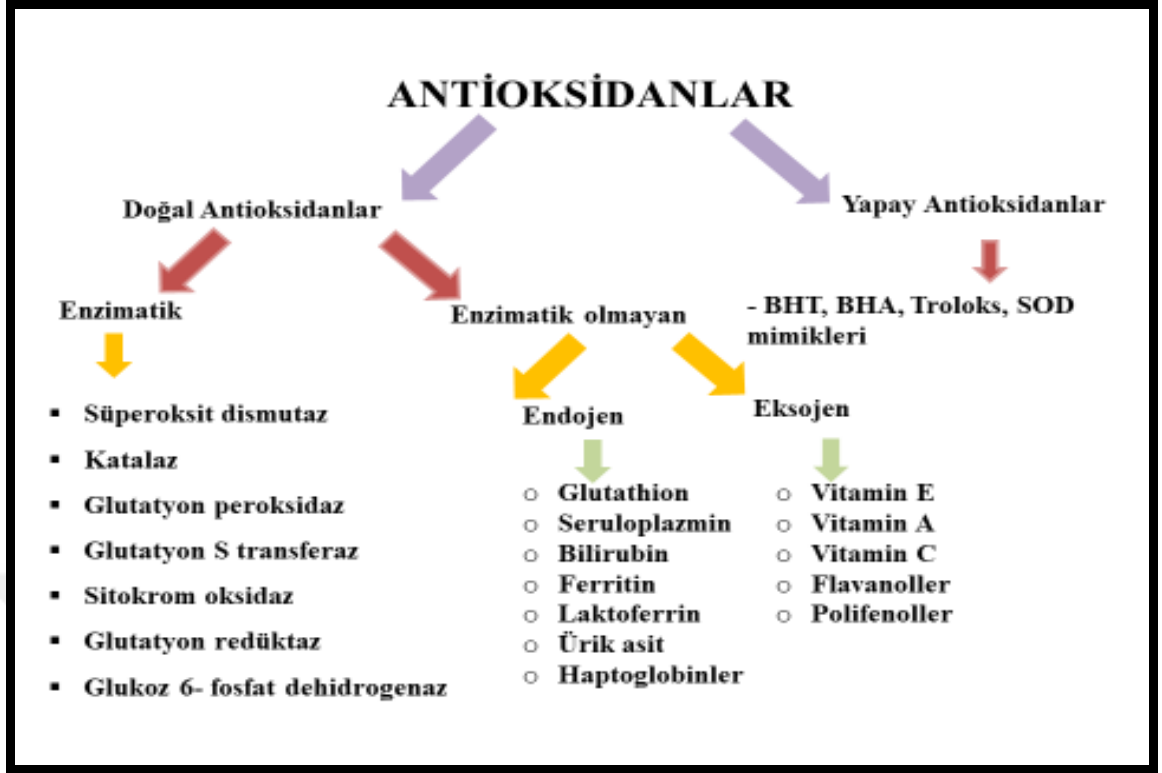
Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip, ayrıca yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllere "antioksidan" adı verilir (Kahkönen *vd.*, 1999). Antioksidanlar, vitamin ve mineral gibi besin öğeleri ve vücuttaki kimyasal reaksiyonları destekleyen protein yapısındaki enzimlerdir (Anonim, 2011) (Şekil 2.6).

Antioksidanlar, mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Birincil antioksidanlar, mevcut radikallerle reaksiyona girerek bunların daha zararlı formlara dönüşmelerini ve yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir ve bilirubin, ferritin, seruloplazmin ve ürik asit gibi spesifik olmayan yüksek moleküler ağırlıklı enzimatik olmayan endojen antioksidanlardır (Akbulut *vd.*, 2014). Bunlar metal iyonlarını bağlama, serbest radikalleri yakalama, hapsetme ve süpürme gibi etkilere sahiptir. İkincil antioksidanlar ise genellikle bitkiler tarafından sentezlenen, çeşitli vitamin ve fenolik maddelerden oluşan, dışarıdan alınarak etkinlik gösteren ve enzimatik olmayan ekzojen antioksidanlardır (Jerry *vd.*, 2000; Kolaylı *vd.*, 2003, Kolaylı ve Keha, 1999). Bunlar düşük moleküler ağırlıklı olup glutatyon, askorbik asit (C vitamini) gibi suda çözünen, karotenoid (β -karoten dahil), retinol (A vitamini) ve

α - tokoferol (E vitamini) gibi yağda çözünen bileşiklerdir. Bunlar serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırmada görev alırken aynı zamanda GSH, GPx ya da GST gibi antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin kofaktörü olarak da rol oynar. Enzimatik yapıda olan antioksidanlar, hücrenin çeşitli organellerinde etki gösterirler. SOD, CAT, Se-GPx, Glutasyon S-transferaz, sitokrom oksidaz, DT-diaforaz gibi enzimleri içerir ve GR, G6PDH gibi gerekli kofaktörleri sağlarlar (Şekil 2.6, Şekil 2.7).



Şekil 2.6 Hücrenin antioksidan savunma mekanizması (Tuna-Keleştemur ve Özdemir, 2011)



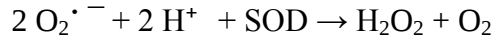
Şekil 2.7 Antioksidanların sınıflandırılması (Yıldız, 2011).

2.4.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD; EC.1.15.1.1)

Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ilk olarak oksijenli solunum yapan canlılarda Mc. Cord ve Fridovich tarafından 1978 yılında tespit edilmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene tek elektronlu dismutasyonunu katalizler (Chaudiere ve Iliou, 1999). Bu tepkime sonucunda ortamda oluşan H_2O_2 , GPx ve CAT enzimi ile etkisiz hale getirilmektedir (Yıldız, 2011). Bu reaksiyon spontan olarak meydana gelebilir, ancak SOD tarafından katalizlendiğinde reaksiyon hızı yaklaşık 400 kat artabilmektedir. SOD' un üç tipi bulunmaktadır, bunlardan ikisi sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu/Zn-SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, Mn ihtiva eden izomerdir (Mn-SOD). Üçüncü tip ise ekstraselüler SOD' dır. SOD' ın ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. Genel olarak, hücrede en çok bulunan izomer sitozolik Cu/Zn-SOD' dir. Enzimin primer fonksiyonu, hücreleri süperoksit radikalının zararlı etkilerinden korumaktır. Bu şekilde hücrelerdeki lipid peroksidasyonu da inhibe edilmiş olur. SOD, fagosit edilen bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol

oynamaktadır. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir (Kılbaş, 2006).

SOD enzimi hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etme konusunda oldukça önemli bir role sahiptir (Fridovich, 1983).



SOD, iki reaktif oksijen türünü, radikal olmayan moleküllere dönüştürmekle antioksidan sistemin en önemli öğelerinden birini oluşturmaktadır. SOD aktivitesinin fazla olduğu yerler oksijen kullanımının yüksek olduğu dokulardır. Serbest radikali substrat olarak kullanabilmesi yönüyle CAT ve GPx' dan farklılık göstermektedir. Sitozolik (Cu-Zn SOD) ve mitokondriyal SOD (Mn SOD) aktivitelerinde pH' nın etkisi farklı olmaktadır, pH' nın 7 olduğu durumlarda hem Cu-Zn SOD hem de Mn SOD aktiftir. Cu-Zn SOD' ın aktivitesi pH 5,5-10 aralığında değişmez ancak Mn-SOD aktivitesi pH 7' nin üzerine çıktığında kaybolmaktadır (Harris,1992; McCotd ve Fridovich, 1978; Masaki vd., 1988).

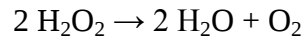
SOD' un ürünü olan H₂O₂, toksik olduğundan dolayı bu enzim detoksifiye edici değildir. Ancak bu reaksiyonla birlikte reaktif oksijen radikallerinin detoksifikasyonunun ilk aşaması tamamlanmaktadır. Bir sonraki aşamada CAT ve GPx H₂O₂' nin suya dönüşmesini katalizlemektedir (Harris, 1992).

2.4.1.2 Katalaz (CAT; E.C 1.11.1.6)

1937 yılında Sumer ve Dounce tarafından kristalize olarak saflaştırılan CAT enzimi hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda oldukça yaygın olarak bulunmaktadır (Yıldız, 2011). CAT (EC.1.11.1.6) glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. Enzimin molekül ağırlığı 240 bin daltondur. Her biri ferriprotoporfirin grubu içeren dört adet alt üniteden oluşmuştur (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Ferriprotoporfirin, prostetik grubunda 43 değerlikli Fe atomu bulunan protoporfirin IX halkasıdır (Gürdal ve Ademoğlu, 2005; Onat vd., 2002). Eritrositler yüksek oranda CAT içermekte olup, CAT aktivitesinin %98' den fazlasını sağlarlar. CAT enzim aktivitesinin en yüksek olduğu dokular

karaciğer ve böbrektir. Enzim, dokularda başlıca mitokondri ve peroksizom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Ayrıca, endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir. CAT, okside edici enzimlerin etkisi ile ortamda oluşan H_2O_2 ' i doğrudan suya dönüştürür. Ortamdaki hidrojen peroksit konsantrasyonunun düşük olduğu durumlarda hidrojen peroksiti substrat olarak kullanan diğer antioksidan enzimler (GSH-Px) devreye girerek hidrojen peroksiti ortamdan uzaklaştırırlar. Aynı etkileri gösteren CAT ve GSH-Px enzimleri, hücre içi yerleşimleri ve etki yerleri bakımından farklılıklar gösterirler. CAT enzimi peroksizomlarda daha etkin iken, GSH-Px enzimi başlıca sitozol ve mitokondride etkindir (Kılbaş, 2006). CAT' ın indirgeyici aktivitesi hidrojen peroksit ve metil-etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (Jenkins ve Tengi, 1981). CAT, GPx ile karşılaştırıldığında daha yüksek kararlılıktaki H_2O_2 konsantrasyonlarını temizlediği gözlenmektedir (Radi vd., 1991).

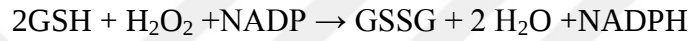
Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 ' i glutatyon peroksidaz parçalarken, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz bu görevi yerine getirmektedir. Görevi, H_2O_2 ' i oksijen ve suya parçalamak olan CAT, peroksidaz enzim aktivitesine sahip olmakla birlikte bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilmektedir (Akkuş, 1995).



H_2O_2 ' nin düşük miktarlarda bulunması hücrede fizyolojik işlemlerin (hücre ölümü, karbonhidrat metabolizması, mitokondriyal fonksiyon ve trombosit aktivasyonu vb.) yürütülmesine yardımcı olmaktadır (Dröge, 2002). Ancak, H_2O_2 ' nin yüksek konsantrasyonda bulunmasının hücre için yarattığı zararın etkin bir şekilde sınırlandırılabilmesi için CAT enzimi önemli bir savunma elemanıdır (Aslankoç, 2019).

2.4.1.3 Glutatyon peroksidaz (GPx; EC.1.11.1.9)

GSH-Px (EC.1.11.1.9), hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Tetramerik yapıdadır ve 4 selenyum (kofaktor) atomu içermektedir. Enzim aktivitesi heksoz monofosfat yolunda üretilen NADPH' a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂, öncelikle GSH-Px tarafından temizlenir. Bu enzim, GSH' nin okside glutatyonla dönüştüğü ortamda H₂O₂' i yüksek spesifite ile detoksifiye etmektedir. GSH' nin GSSG haline dönüştüğü reaksiyonda GSH-Px enzimi ile H₂O₂ suya indirgenmiş olur. Daha sonra GSH enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak, okside glutatyon redükte hale dönüştürülür (Kılbaş, 2006).

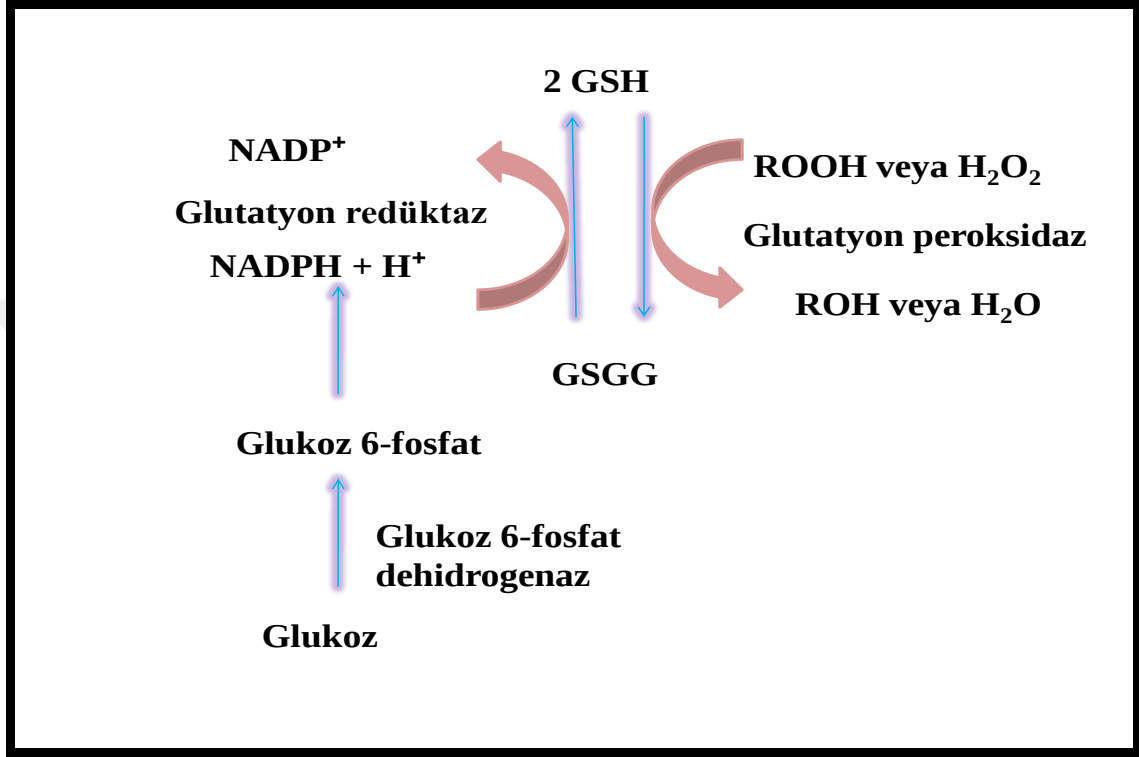


GPx' ın selenyuma bağımlı ve selenyuma bağımlı olmayan olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı olan GPx (Se- GPx) sitozol ve mitokondride bulunmakta ve H₂O₂ ve lipid hidroperoksitleri metabolize etmektedir. Selenyuma bağımlı olmayan GPx (non-Se GPx) ise yalnızca lipid hidroperoksitleri metabolize etmekte ve bu özelliği ile lipid peroksidasyonunun başlamasını ve ilerlemesini önlemektedir (Michiels vd., 1994). Ayrıca, E vitamini yetersizliğinde peroksidasyona karşı membranı korumakla görevlidir. Selenyum, GPx' in bir parçası olduğu için selenyum eksikliğinde GPx yetersizliği gözlenebilmektedir (Jialal ve Grundy, 1993; Steinberg ve Chait, 1998; Young ve Woodside, 2001; Chao vd., 2002).

GSH-Px' in, fagositik hücrelerde de önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlarla birlikte GSH-Px, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır. GSH-Px aktivitesindeki azalma, H₂O₂' in artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Sitosolik GSH-Px sitosolde ve mitokondriyal matrikste bulunur (Yılmaz, 2010).

Aminoasitlerin taşınması, koenzim görevinde bulunması ve ksenobiyotiklerin toksisitesinin giderilmesi gibi görevleri de bulunmaktadır (Aktaş, 2005; Sözmen, 2002; Esterbauer vd., 1992; Arrick ve Nathan, 1984). Lipid peroksitlerinin yağ asitlerine

indirgenmesi işlemi sırasında, glutatyonu kofaktör olarak kullanması sebebiyle aktif merkezinde selenosistein bulunan GPx aktivitesi için glutatyonun belirli bir düzeyde olması gerekmektedir (Devay, 2008; Akkuş,1995; Basaga, 1990; Fantone ve Ward, 1985) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 GPx ve GR' nin katalizlediği reaksiyon (Yıldız, 2011).

2.5 Lipid Peroksidasyonu

2.5.1 Malondialdehit (MDA)

Serbest radikallerin neden olduğu hasarların en önemlilerinden olan lipid peroksidasyonu (de Zwart vd., 1998) çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) oksidasyonu olarak da bilinir. Biyolojik membranlarda meydana gelebilecek lipid peroksidasyonu, membran akışkanlığının kaybına, membran potansiyelinin düşmesine,

iyonlara karşı geçirgenliğinin artışına ve sonunda hücrenin bütünlüğünün bozularak ölümüne yol açar (Yaprak, 1998). MDA lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir indikatördür (Ohkawa vd., 1979). Üç karbonlu bir ketoaldehid olan MDA, normal metabolik şartlarda, önce asetat veya malonata kadar okside olur, daha sonra CO₂' e indirgenerek atılır. Lipid peroksidasyonunun çok fazla artması sonucunda MDA konsantrasyonu da artar ve dokulara hasar verir (Uluslu vd., 2003; Devay, 2008).

Proteinlerin lizin rezidüleriyle ve fosfolipidlerin amin gruplarıyla reaksiyona girer ve fonksiyonel bozukluklara yol açar (Uchida, 2003; Devay, 2008). Ayrıca, kolaylıkla diffüze olabildiğinden, DNA bazlarıyla da reaksiyona girerek hasara neden olabilir (Yıldız, 2011). Biyolojik sistemlerdeki oksidatif stresin ölçülmesinde günümüzde en yaygın metot, MDA ölçümüdür.

2.6 Sucul Canlılarda Gestajen Maruziyetine İlişkin Çalışmalar

Balıklar, amfibiler ve suda yaşayan sürüngenler, su ortamında doğal ve sentetik steroid hormonlar ile ortamda bulunan farklı kimyasal maddelere maruziyetin etkilerini gösteren indikatörler olarak kullanılmaktadır (Damstra vd., 2002; Richardson vd., 2005; Kloas vd., 2009; Bergman vd., 2013). Araştırmalar, östrojenik, androjenik ve tiroidojenik bileşiklerin ve bu bileşiklere ait reseptörlere ilişkin bazı antagonistlerin sucul ekosistem üzerindeki etkilerine odaklanmıştır. Balık başta olma üzere tüm sucul sistemde gestajen maruziyet çalışmalarının sonuçları, üreme, gelişme ve davranışta değişiklik olduğunu göstermektedir (Orlando ve Ellestad, 2014).

Balıklarda, çevresel gestajenlerin potansiyel etkilerini inceleyen araştırmalar, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), zebra balığı (*Danio rerio*), dikence balığı (*Gasterosteus aculeatus*), medaka (*Oryzias latipes*) ve sazangiller (*Pimephales promelas*) dahil olmak üzere kemikli balıklarda gerçekleştirilmiştir. Bazı araştırmalar, progestinlerin farklı balıklarda biyokümüleyon yeteneklerini incelemiş olsa da, yayınlanan çalışmaların çoğu, balıkların bir veya daha fazla gestajen konsantrasyonuna maruz kaldığı yönündedir (Orlando ve Ellestad, 2014).

Besse (2009), insanlar tarafından kullanılan gestajenlerin çevre üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Bu moleküllerle ilgili sınırlı verilerden dolayı çevresel risk üzerine kapsamlı bir sonuç elde edilemese de, gestajenlerin ve metabolitlerinin tehlikesini ve biyolojik etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur. Bu kapsamda sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- Sentetik progestinlerin atık örneklerinde ve muhtemelen yüzey sularında, özellikle de metabolitler halinde, 1^{-1} ve hatta 100^{-1} ng/L aralığındaki konsantrasyonlarda bulunması,
- Progestojenik aktiviteye sahip ana bileşiklerin ve bazı aktif metabolitlerin balıkta yumurtlama davranışını etkileyebilmesi,
- Nortestosterondan türetilen progestinlerin metabolitlerinin östrojenik bileşikler olarak hareket edebildiği ve bu nedenle etinilestradiol gibi diğer ksenöstrojenler ile ek olarak etki edebildiği ve böylece serbest radikal oluşumunu tetiklemesi,
- Klormadinon asetat, siproteron asetat ve bunların metabolitleri gibi bazı progestinlerin anti-androjenik olması ve sucul türler için risk oluşturmasıdır.

Pietsch ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada, medroksiprogesteron asetatın (MPA), baş ve gövde böbrek hücreleri tarafından nitrik oksit oluşumunu önemli ölçüde azalttığı için balıklardaki doğal bağışıklık sistemini etkileyebildiği gözlemlenmiştir. Hem LNG hem de drospirenonun (DRO) erişkin sazanğillerde (*Pimephales promelas*) üremeyi engellediği bildirilmiştir.

Paulos ve arkadaşları tarafından (2010) Japon medaka balığı ile yapılan 28 günlük çalışmada, Norethindrone (NET)' in 25 ng/L ' den büyük konsantrasyonlarda üremede önemli bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Morfolojik değişikliklerin de (örneğin dişi balıkların yüzgeçlerinde görülen benekler), NET maruziyetinin balıklar üzerinde kuvvetli androjenik bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Progesteron hormonunun (P4) *Pimephales promelas*' da 375 ng/L gibi yüksek konsantrasyonda uygulanmasının, üreme ve embriyonik gelişim açısından etkileri incelenmiştir. Balıklar 21 gün boyunca 0, 10, 100 ve 1000 ng/L P4 konsantrasyonlarına maruz bırakılmış, deney sonucunda, P4' ün yumurta sayısı ve döllenme başarısında düşüşe neden olduğu ve dişilerde gonadosomatik indeksi ve vitellojenin gen ekspresyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir (DeQuattro vd., 2012).

Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer, böbrek ve dalak dokusunda MDA, GSH, GPx, GR ve GST enzim aktivite değerleri 21 gün süresince incelenmiştir. Bu amaçla, zerdeçal balık yemlerine 10, 20, 40 mg/kg yem olmak üzere 3 farklı doz olarak ilave edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında zerdeçalın uygulandığı tüm gruplarda MDA seviyesinin düştüğü, GPx, GR ve GST aktivite değerleri ile GSH düzeyinin ise arttığı tespit edilmiştir (Mişe Yonar vd., 2014).

Başka bir çalışmada ise progesteron, didrogesteron, drospirenon ve tüm progesteron türevi progestinlerin zebra balığında beyin aromatazının (*cyp19a1b*) glial hücrelerine ilişkin gen ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yapılan çalışmada yeşil floresan protein (GFP) ekspresyonu üzerinde bu progestinlerin etki göstermediği görülmüştür. Ancak, 19-nortestosteron türevi progestinlerin, radyal glial hücrelerde *cyp19a1b* ekspresyonunu teşvik ederek östrojenik aktiviteyi ortaya çıkardığı tespit edilmiştir (Cano-Nicolau vd., 2016).

DeCourten ve Brander' ın 2017 yılında yaptığı çalışmada gümüş balığının (*Menidia beryllina*) birden fazla nesil boyunca EBK' ya maruz kalmasının üreme ve gelişme üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Etinilestradiol' e (EE2) 21 gün boyunca 1 ng/L dozunda maruz bırakılan balıkların önemli ölçüde etkilendiği, ayrıca bir sonraki nesil üzerinde ölüm oranında ve gelişimsel deformasyonlarda artış olduğu gözlenmiştir.

Yetişkin zebra balıklarında hipotalamik-hipofiz-gonadal (HPG) eksenini boyunca yumurta üretimi, histoloji ve transkripsiyonel ekspresyon profilleri ölçülerek sentetik progestin norgestrelin (NGT) üreme üzerine olan etkilerinin incelenmesinin planlandığı bir çalışmada, balıklar 21 gün boyunca 6, 29 ve 69 ng/L NGT' ye maruz bırakılmıştır. Buna

göre, 69 ng/L NGT' ye maruz bırakılmanın belirli transkripsiyonel değişikliklere yol açtığı görülmüştür. Bu durum NGT' nin zebra balıklarında güçlü progestojenik ve androjenik aktiviteler sergileyebileceğini açıklamıştır (Liang vd., 2018).

Hou ve arkadaşlarının (2018) yaptığı bir çalışmada, endokrin bozucu bir kimyasal olan NET' in *Danio rerio* üzerinde cinsiyet farklılaşmasına dair etkileri ve bu etkilerin altında yatan mekanizmalar araştırılmıştır. Juvenil formdaki (döllenmeden 20 gün sonra) zebra balıkları 45 gün boyunca 5, 50, 500 ve 1000 ng/L NET' e maruz bırakılmışlardır. Araştırmada, popülasyonun cinsiyet oranı, gonad histolojisi, cinsiyet farklılaşması ve steroidogeneizde yer alan düzenleyici genlerin transkripsiyonel profili incelenmiştir. Sonuçlar NET' e maruziyetin, erkeklerde cinsel olgunluğun hızlanmasına ve dişi zebra balıklarında yumurtalık olgunlaşmasında gecikmeye neden olduğunu ortaya koymuştur.

Bir başka çalışmada ise, etonogestrelin erkek ve dişi Endler lepidisteslerinin (*Poecilia wingei*) üreme davranışı, doğurganlığı, gonad histolojisi ve sekonder cinsiyet özellikleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Balıklar, 34 gün boyunca etonogestrelin 3,2 ng/L ve 320 ng/L olmak üzere iki farklı konsantrasyonuna tabi tutulmuştur. Daha sonra balıklar çiftleştirilmiş ve etonogestrele maruz kalan balıklarda çiftleşme sıklığının kontrol grupları ile kıyaslandığında oldukça az olduğu ortaya çıkarılmıştır. Kimyasala maruz kalan tüm dişilerin üreyemediği de gözlenmiştir. Ayrıca, etonogestrele maruz kalan dişilerde daha az gelişmiş oosit bulunduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, düşük etonogestrel konsantrasyonu (3,2 ng/L), erkeklerde üreme başarılarını etkilemeden çiftleşme aktivitesinde bir azalmaya yol açmış, ancak dişilerde üremeyi tamamen engellemiştir (Steinbach vd., 2019).

Wen-Jun Shi ve arkadaşları (2019) tarafından Dydrogesterone' in (DDG) yetişkin *Danio rerio* üzerindeki kısa süreli etkileri araştırılmıştır. Yetişkin zebra balıkları üzerinde yapılan bu çalışmada, balıklar, 32 ng/L, 305 ng/L ve 2490 ng/L olmak üzere DDG' nin üç farklı dozuna 14 gün boyunca maruz bırakılmıştır. RT-PCR analizi, DDG' nin dişi balıkların beyin dokusunda gonadotropin salgılayan hormon (GnRH) yolağında yer alan pek çok genin transkriptini önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Erkek bireylerin beyininde ise bu genlere ilişkin transkripsiyonların düşüşü gözlenmiştir. Yumurtalıkta cyp19a1a' nın transkripsiyonunun 2490 ng/L DDG' de 2,3 kat artışa sahip olduğu ve

testiste hsd17b2' nin transkripsiyonunun ise 305 ng/L DDG' de 2 kat, 2490 ng/L DDG' de 2,4 kat arttığı tespit edilmiştir. Histopatolojik analiz, 2490 ng/L DDG' ye maruz kalmanın yumurtalıktaki atretik folikül yüzdesini önemli ölçüde artırdığını ortaya koymuştur. Bu çalışmanın sonucunda, DDG' nin potansiyel endokrin bozucu etkilere sahip olduğu ve zebra balıklarında yumurtalık gelişimini etkilediği belirlenmiştir.

NGT' nin, yetişkin dişi sivrisinek balığında (*Gambusia affinis*) yüzgeç morfolojisi ve karaciğer transkriptomu üzerine etkileri Hou vd., (2019) tarafından değerlendirilmiştir. Balıklar, 42 gün boyunca 377 ng/L NGT' ye maruz bırakılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, en büyük ifade değişikliklerini gösteren genlerin, yüzgeç gelişimi, androjen biyosentezi, lipid ve yağ asidi metabolizmaları ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Chen ve arkadaşları tarafından 2021 yılında yapılan bir çalışmada, yaygın olarak kullanılan bir progestin olan gestodenin (GES) seks hormonu sentezi ile ilişkili genlerin ifadelerini değiştirip değiştiremeyeceği ve morfolojik özelliklerde, kur davranışında ve oosit gelişiminde değişikliklere neden olup olmayacağına dair bir deneme yapılmıştır. GES' in farklı konsantrasyonlarına (2,96; 32,9 ve 354 ng/L) 40 gün boyunca maruz kalan sivrisinek balığında (*Gambusia affinis*), özellikle 354 ng/L' de, dişi balıklarda erkekleşmeyi etkilediği, vücut ağırlığının boy oranına göre azalma gösterdiği tespit edilmiştir.

Japon medaka (*Oryzias melastigma*) larvalarına NET' in 10 gün boyunca 1,31 ng/L uygulanması sonucunda yüzme davranışı, hormon seviyeleri, oksidatif-antioksidan enzim aktiviteleri, gen transkripsiyon modelleri ve gonad farklılaşması üzerinde potansiyel olarak toksik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir. Deniz ortamında bulunan NET' in, balık sağlığı için potansiyel risklere sahip olduğu ve bu nedenle sucul kaynakları yok edebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Dong vd., 2023).

NGT' nin toksisite mekanizması hakkında fikir vermesi amacıyla istiridye *Macrta veneriformis*' te yapılan çalışmada, 0, 10, ve 1000 ng/L dozlarda, 21 gün boyunca uygulanan NGT' nin steroid hormon metabolizmasını bozduğu ve antioksidan savunma sistemine zarar verdiği kanıtlanmıştır. Bu etkiler, NGT' nin transkriptlerini ve

metabolitlerini değiştirerek istiridyeler üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğini göstermektedir (Zhao vd., 2023).

2.6.1 LNG maruziyetine ilişkin alışmalar

Zeilinger ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada, LNG' nin sazangillerden *Pimephales promelas* üzerine 21 günlük etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, 0,8; 3,3 ve 29,6 ng/L konsantrasyonda LNG' ye maruz bırakılan balıklarda en düşük konsantrasyon olan 0,8 ng/L' de erkek cinsiyet özelliği üzerine etkisinin olmadığı, ancak daha yüksek konsantrasyonlar olan 3,3 ve 29,6 ng/L dozunda dişilerde erkekleşme üzerine etki ettiği saptanmıştır.

Kroupova ve arkadaşlarının (2014), LNG' nin, sazangillerden bir tatlı su balığı türü olan *Rutilus rutilus*' un endokrin sistemi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deney 28 gün olarak planlanmış ve bu sürede balıklar 3, 31, 312 ve 3124 ng/L olmak üzere LNG' nin dört farklı dozuna maruz bırakılmışlardır. LNG' ye 31 ng/L' den yüksek miktarda maruz kalan erkeklerde, gonadlarda üretilen ve büyük bir androjen olan 11-Ketotestosteron (11-KT) düzeyinde azalma gözlenmiştir. Diğer iki doz olan 31 ve 312 ng/L LNG' ye maruz kalan erkek bireylerin ise yüksek oranda spermatogonia ürettikleri grlmştir. Östrojen reseptörleri üzerine 3124 ng/L LNG dozunun hem dişi hem de erkek balıklarda bu reseptörlerde artışa neden olduğu saptanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, LNG' nin, cinsiyet hormonu seviyelerini etkileyerek balıkların üreme sisteminde bozukluklara yol açtığını ortaya koymaktadır.

LNG' nin zebra balığında (*Danio rerio*) cinsiyet farklılaşması üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada embriyolar, evre ile ilgili beş farklı konsantrasyonda (0, 1, 10, 33 ve 100 ng/L) LNG' ye maruz bırakılarak cinsel olgunluğa kadar gelişimleri takip edilmiştir. Döllenme sürecinden 63 gün sonra yapılan histolojik incelemede, 10, 33 ve 100 ng/L' ye maruz kalan balıklarda %100 erkekleşme gözlenmiştir. Bu alışma, çevreyle ilgili LNG konsantrasyonlarının zebra balığında cinsiyet farklılaşmasına neden olduğunu ve gonadal gelişimi değiştirebileceğini göstermiştir (Hua vd., 2015).

Svensson ve arkadaşları 2016' da yaptıkları çalışmada, yavru zebra balıkları cinsiyet farklılaşması sırasında, 5,5; 79 ve 834 ng/L olmak üzere üç farklı LNG konsantrasyonuna maruz bırakılmışlardır. Bunun sonucunda, en düşük konsantrasyonda bile %100 erkekleşmenin görüldüğü bildirilmiştir.

Brockmeier tarafından (2016), Doğu Sivrisinek Balığı (*Gambusia holbrooki*) ile LNG' ye maruz kalmanın etki mekanizmalarını değerlendirdikleri bir araştırma yapmışlardır. Bu çalışmada, progestinlere ve anti-progestajenlere maruz bırakılan erkek ve dişi balıklarda hepatik mikroarray analizi yapılmış, LNG' nin, progesteron ve androjen reseptörü antagonistleri ile birlikte maruz bırakılma sırasında anal yüzgeç büyümesini nasıl modüle ettiğini belirleme yeteneği değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon analizleri, 48 saat boyunca agonist LNG, antagonist mifepriston veya iki kimyasalın karışımına maruz bırakılan erkek ve dişi balıklar üzerinde yapılmıştır. Mikroarray analizi sonucunda, mifepristonun karaciğer dokularında bir anti-progestajen gibi hareket etmediğini ve LNG' nin embriyo gelişimi ve lipid taşınması süreçleri üzerinde güçlü etkiler ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Ayrıca LNG' nin dişilerde, erkek sekonder cinsiyet karakter oluşumunu tetiklediği, androjen veya LNG' nin anti-androjen flutamid varlığında anal yüzgecin uzamasını önlediği saptanmıştır.

Sıcaklık ve endokrin bozucu gibi çoklu stres faktörleri arasındaki etkiler üzerine yapılan bir deneyde, sıcaklığın ve LNG' nin zebra balığının (*Danio rerio*) kondisyonu ve üreme üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Sıcaklığı (temel olarak ortam sıcaklığını 27°C, ısınmaya (+3°C) karşı ayarlayarak) ve LNG seviyelerini (10 ng/L ve 1000 ng/L) değiştirerek 21 gün boyunca çok faktörlü bir deney uygulanmıştır. Sıcaklığın artması dişilerin gonadosomatik indeksinde (GSI) düşüşe neden olurken, LNG' nin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Ancak, yumurta sayısı hem sıcaklıktan hem de LNG' den olumsuz olarak etkilenmiştir. LNG' nin 1000 ng/L konsantrasyonuna (her iki sıcaklıkta 27°C ve 30°C) maruz bırakılan balıkların üreme faaliyetinde bulunmadığı gözlenmiş, bununla beraber daha yüksek bir sıcaklıkta en düşük progestin dozuna (10 ng/L) maruz bırakılan balıklarda üreme bozukluğu meydana geldiği saptanmıştır. Buna göre, yüksek doz (1000 ng/L) LNG konsantrasyonunda yumurtalıkta olgunlaşma derecesinin en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, gelecekteki bir küresel ısınma ve sentetik hormona maruz kalma senaryosunda, zebra balığı gibi balık türlerinin

üremesinin tehlikede olabileceğini ve ilgili su ekosistemlerinin yapısını ve işleyişini etkileyebileceğini göstermektedir (Cardoso vd., 2017).

Cardoso ve arkadaşları tarafından (2019) yapılan çalışmada iklim değişikliği ve ilaç kirliliğinin etkileri incelenmiştir. Deneyde, yetişkin zebra balıkları 21 gün boyunca 27°C ve 30°C farklı sıcaklıklarda ve LNG' nin 10 ng/L ve 1000 ng/L farklı dozlarına birlikte maruz bırakılmıştır. Elde edilen sonuçlarda, sıcaklık ve progestinler gibi çoklu stres faktörlerinin zebra balığının LNG' ye maruz kalan bireyler için hepatosit hacminin sayı dağılımının (CVN(y)) varyasyon katsayısında bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışma, LNG' nin potansiyel olarak suda yaşayan diğer organizmalar üzerindeki etkileri hakkında bir uyarı işareti olarak görülmesi gerektiğini göstermiştir.

LNG' nin yüksek ekolojik riskini gösteren bir diğer çalışmada ise, yumurtadan yeni çıkmış minnow balığı larvaları (*Gobiocypris rarus*) 1 ng/L ve 10 ng/L LNG' ye 6 ay boyunca maruz bırakılmışlardır. Balıkların dişi/erkek oranı maruziyetten etkilenmemiş, buna rağmen yapılan histolojik değerlendirme sonucunda, gonadal gelişimin bozulduğu ortaya çıkmıştır. Doz uygulamasında 1 ng/L LNG, dişilerde estradiol ve her iki cinsiyette de testosteron plazma konsantrasyonlarını önemli ölçüde teşvik etmiştir. DNA metilasyon seviyesinin 10 ng/L' ye maruz kalan balıklarda testis dokusunda önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir (Hua vd., 2022).

LNG' nin zebra midyesinde (*Dreissena polymorpha*) biyoakümüülasyonunun ve antioksidan savunma mekanizmasına olan etkilerinin incelendiği bir çalışmada, LNG' nin protein hasarına yol açtığı ve SOD gen ifadesinin oksidatif stresi gösterecek şekilde arttığı tespit edilmiştir (Contardo-Jara vd., 2011).

Hoffman ve Kloas (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, LNG' nin erkek Afrika pençeli kurbağasında (*Xenopus laevis*) çiftleşme davranışını etkileyip etkilemediği araştırılmıştır. Bunun için, erkek kurbağalar LNG' nin üç farklı kontrasyonuna (10^{-7} M, 10^{-8} M ve 10^{-10} M) maruz bırakılmışlardır. LNG' nin tüm konsantrasyonlarının kurbağalarda cinsel uyarımı arttırdığı gözlenmiştir. Bununla birlikte LNG' nin, dişilerdeki üreme davranışına olumsuz etkilerinin bulunduğu ve LNG' ye maruz

bırakılmanın bu canlıların üreme başarısının azalmasına neden olabileceği sonucu çıkarılmıştır.

Lorenz ve arkadaşlarının (2016) Afrika pençeli kurbağaları (*Xenopus laevis*) üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, LNG' nin 0,01 ve 10 nM farklı dozlarının 72 saat uygulanmasının tiroid hormonuna etkileri incelenmiştir. Yavru kurbağalar üzerinde yapılan bu çalışmada beyin-hipofiz dokusunda herhangi bir değişiklik saptanmazken, tiroidal gen ekspresyonunun LNG' den kolayca etkilendiği gözlenmiştir.

Frankel ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, 8 gün süresince LNG' nin 10 ng/L ve 100 ng/L olmak üzere iki farklı doz halinde uygulamasının sivrisinek balıklarına uygulanmıştır. Anal yüzgeç üzerindeki patoloji ve balıkların üreme davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Balıklar 100 ng/L LNG' ye maruz kaldıklarında erkek bireylerin cinsel davranışında artış olduğu ve balıkların anal yüzgeçlerinde uzama olduğu gözlenmiş, ayrıca dişilerde erkekleşme görülmüştür.

LNG' nin iki farklı dozunun 24 saat süre ile uygulamasının (10 nM ve 100 nM), dişi kurbağalarda gonadlar üzerinde erkeklerde testislerde daha yüksek duyarlılığa neden olduğu tespit edilmiştir. Afrika pençeli kurbağa (*Xenopus laevis*) larvalarında yapılan bu deneyde LNG, tiroid sistemini aynı zamanda ciddi biçimde tahrip etmiştir. LNG' nin yalnızca üreme sistemini etkilemediği, bunun yanında tiroid sisteminde bozukluklara yol açarak canlının gelişimini de olumsuz etkileyebileceği bildirilmiştir (Zikova vd., 2017).

Ayrıca, tatlı su salyangozu türü olan *Lymnaea stagnalis*, progesteron, LNG, drospirenon ve gestoden olmak üzere dört progestajenin karışımına (10 ng/L), 3 hafta boyunca maruz bırakılmıştır. Maruziyet sonucunda ilk haftada yumurta üretimi azalmış ve düşük kaliteli yumurta gözlenmiştir (Zrinyi vd., 2017).

Deniz tarağı (*Ruditapes decussatus*) üzerinde yapılan bir çalışmada, 1000 ng/L LNG' nin tek başına veya 20, 24 ve 28°C' lik artan su sıcaklıklarıyla birlikte kullanımının biyokimyasal parametreler ve gonad histolojisi üzerindeki etkileri 28 gün süreyle araştırılmıştır. Deneme sonucunda sadece LNG ile muamele edilen deniz taraklarında oksidatif strese karşı savunmada bozulma, lizozomal membran stabilitesinde azalma, ve

gonad oosit sayısında azalma olduğu gör÷lm÷ştür. Ayrıca, tek başına veya LNG ile kombinasyon halinde 20, 24 ve 28°C su sıcaklığı stresine maruz kalmanın, SOD antioksidan aktivitesini arttırdığı ve canlının fizyolojik süreçlerini değıştirdiğı gözlenmiştir (Mannai vd., 2021).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Deneme alanı

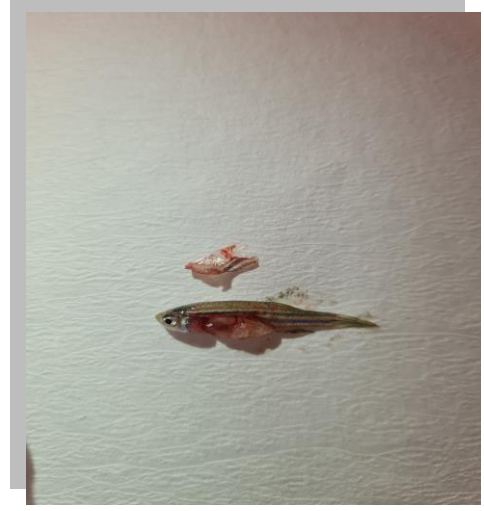
Denemede, sentetik bir progestin olan Levonorgestrel (LNG)' in farklı doz ve süre uygulamalarının Zebra balıklarında (*Danio rerio*) antioksidan savunma sistemine olan etkileri enzimatik antioksidanlar; Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Malondialdehit (MDA) değerleri üzerinden incelenmiştir. Bu bağlamda, denemenin biyodeney bölümü Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Akvaryum Uygulama İstasyonu (Üretim Odası-6)' nda gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın temelini teşkil eden antioksidan enzim aktivite ölçümlerine ait analizler ise Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Ekofizyoloji Laboratuvarı ile Baran Medikal San. Tic. Ltd. Şti.' ne (Ankara) ait AR-GE Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1.2 Deneme materyali

Denemede grup ortalama ağırlıkları $7,24 \pm 0,19$ g ve ortalama uzunlukları $3,02 \pm 0,27$ cm olan 540 adet Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Şekil 3.1) kullanılmıştır. Deneme balıkları ticari bir üretici olan Aksu Akvaryum ve Pet Ürünleri Tic. Ltd. Şti' den (Emek, Ankara) temin edilmiştir. Üretici ile önceden yapılan anlaşma gereği balıkların sadece bu deneme için istenilen boy ve ağırlıkta üretimi sağlanmıştır. Balıkların deney ortamına adaptasyonunun sağlanması için 15 gün önce deneme akvaryumlarına yerleştirilmiş ve günde iki defa *ad libitum* olarak ticari akvaryum balığı yemi (Tetramin flakes pul balık yemi) ile beslenmişlerdir.



a



b



c



d

Şekil 3.1 Deneme balıkları [Zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) a,b,c,d]

3.1.3 Deneme ünitesi

Denemede, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Akvaryum Uygulama İstasyonu (Üretim Odası-6)' nda bulunan 96 L su hacmine sahip 27 adet akvaryum kullanılarak deneme gerçekleştirilmiştir. Her bir deneme grubu (bu deneme gruplarına ait 24, 48 ve 96 saat olmak üzere üç farklı süre, düşük ve yüksek doz olmak üzere iki farklı doz ve kontrol grubu) için kullanılan 3' er adet akvaryum

tesadüfî olarak seçilerek, deneme öncesi temizlenmiş ve dezenfekte edilmiştir (Şekil 3.2).



a



b

Şekil 3.2 Deneme akvaryumları (a, b)

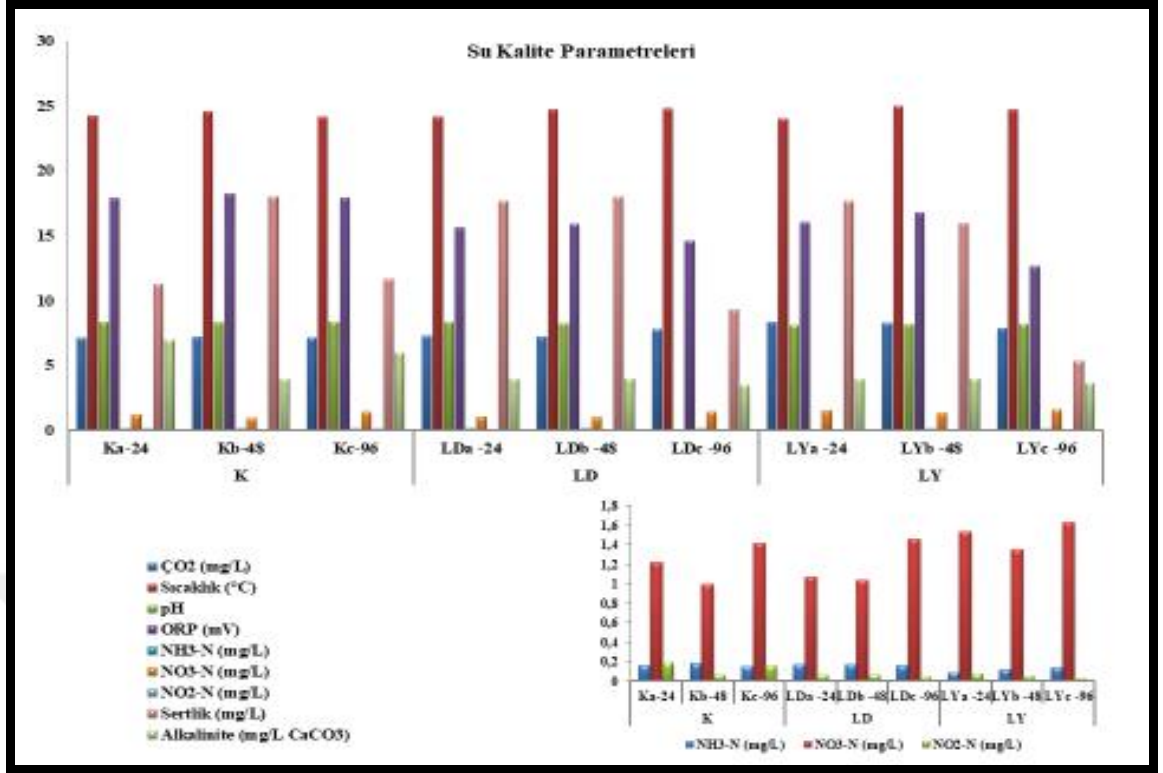
2.3.1 Denemede kullanılan suya ilişkin özellikler

Denemede su kaynağı olarak, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında da kullanılan şehir şebeke suyu kullanılmış ve denemeden önce 30 gün süresince dinlendirilerek içindeki klorun uçması sağlanmıştır. Su kalite parametrelerinden çözünmüş oksijen (ÇO_2), sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$), pH, oksidasyon indirgeme potansiyeli (ORP), amonyak, nitrit, nitrat, sertlik, alkalinite değerleri deneme öncesinde her bir deneme grubunda 3 tekrar ve 2 paralel olarak ölçülmüştür (APHA, 1995) (Çizelge 3.1) (Şekil 3.3).

Çizelge 3.1 Deneme gruplarında su kalite parametrelerine ilişkin değerler (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=6$)

Deneme Grupları*	Deneme Süresi (saat)	Parametre								
		ÇO ₂ (mg/L)	Sıcaklık (°C)	pH	ORP (mV)	NH ₃ -N (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	NO ₂ -N (mg/L)	Sertlik (mg/L)	Alkalinite (mg/L CaCO ₃)
K	K _a -24	7,15 $\pm$ 0,27	24,24 $\pm$ 0,54	8,37 $\pm$ 0,10	17,88 $\pm$ 2,47	0,16 $\pm$ 0,02	1,22 $\pm$ 0,36	0,19 $\pm$ 0,11	11,27 $\pm$ 2,46	7,00 $\pm$ 1,60
	K _b -48	7,24 $\pm$ 0,49	24,56 $\pm$ 0,51	8,32 $\pm$ 0,09	18,22 $\pm$ 2,15	0,18 $\pm$ 0,00	0,99 $\pm$ 0,47	0,06 $\pm$ 0,01	18,00 $\pm$ 1,70	4,00 $\pm$ 0,00
	K _c -96	7,13 $\pm$ 0,17	24,17 $\pm$ 0,16	8,38 $\pm$ 0,03	17,91 $\pm$ 1,88	0,15 $\pm$ 0,01	1,42 $\pm$ 0,32	0,16 $\pm$ 0,24	11,67 $\pm$ 1,87	6,00 $\pm$ 0,00
LD	L _{Da} -24	7,31 $\pm$ 0,29	24,13 $\pm$ 0,90	8,33 $\pm$ 0,04	15,68 $\pm$ 0,71	0,17 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,00	17,67 $\pm$ 1,87	4,00 $\pm$ 0,00
	L _{Db} -48	7,18 $\pm$ 0,43	24,71 $\pm$ 0,69	8,27 $\pm$ 0,05	15,92 $\pm$ 1,86	0,17 $\pm$ 0,00	1,04 $\pm$ 0,19	0,06 $\pm$ 0,00	18,00 $\pm$ 1,71	4,00 $\pm$ 0,00
	L _{Dc} -96	7,76 $\pm$ 0,43	24,78 $\pm$ 0,08	8,19 $\pm$ 0,09	14,61 $\pm$ 1,43	0,16 $\pm$ 0,03	1,46 $\pm$ 0,83	0,04 $\pm$ 0,01	9,33 $\pm$ 6,68	3,47 $\pm$ 0,82
LY	L _{Ya} -24	8,33 $\pm$ 0,25	23,98 $\pm$ 0,37	8,09 $\pm$ 0,25	16,03 $\pm$ 7,49	0,09 $\pm$ 0,06	1,53 $\pm$ 0,53	0,08 $\pm$ 0,10	17,67 $\pm$ 0,78	4,00 $\pm$ 0,00
	L _{Yb} -48	8,29 $\pm$ 0,59	24,99 $\pm$ 1,33	8,15 $\pm$ 0,10	16,74 $\pm$ 3,57	0,12 $\pm$ 0,06	1,35 $\pm$ 0,51	0,05 $\pm$ 0,00	16,00 $\pm$ 1,21	4,00 $\pm$ 0,00
	L _{Yc} -96	7,87 $\pm$ 0,54	24,74 $\pm$ 0,64	8,16 $\pm$ 0,04	12,64 $\pm$ 1,43	0,14 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,43	0,03 $\pm$ 0,00	5,33 $\pm$ 1,97	3,67 $\pm$ 0,78

*K (Kontrol – Sadece Çözgen Madde) : Ka-24, Kb-48, Kc-96
LD (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : LDa -24, LDb -48, LDc -96
LY (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : LYa -24, LYb -48, LYc -96



Şekil 3.3 Deneme gruplarında su kalite parametrelerine ilişkin değerler (Ortalama ± Standart sapma) (n=6)

3.1.5 Denemede Kullanılan Sentetik Progesterone (Levonorgestrel) İlişkin Özellikler ve Uygulama Dozlarının Belirlenmesi

Denemede, ticari adı d(-) Norgestrel (%99; LNG) olan sentetik progestin Levonorgestrel (C₂₁H₂₈O₂) (CAS: 797-63-7) Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) firmasından temin edilmiş ve %0,1 etanol içinde çözündürülerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Denemede uygulanan LNG dozları; 0,312 µg/L ve 6,24 µg/L, Contardo-Jara vd. (2011)' de açıklanan esaslara göre belirlenmiştir.

3.1.6 Denemede kullanılan araç ve gereçler

a) Spektrofotometre

Su parametrelerinin analizinde Shimadzu UV - 1280 marka spektrofotometre kullanılmıştır. Amonyak ve nitrat değerleri 410 nm, nitrit değeri ise 523 nm dalga boyunda ölçülmüştür (APHA, 1995).

Doku örneklerinin enzimatik aktiviteleri belirlenirken ise Rel Assay Diagnostics marka spektrofotometre kullanılmıştır.

b) Multiparametre Su Analiz Cihazı

Su parametrelerinden pH, ORP ve su sıcaklığı ölçümünde Hanna HI9814 (Hanna Instruments, USA) model multiparametre su analiz cihazı kullanılmıştır.

c) Oksijenmetre

Deneme akvaryumlarında suda çözünmüş oksijen ölçümleri Consort C6010 (Consort BBVA, Belgium) model multiparametre ölçüm cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca taşınabilir YSI Professional Plus (Xylem, Inc., USA) model oksijenmetre de kullanılmıştır.

d) Hassas Terazî

Denemenin biyodeney aşamasında balıkların canlı olarak tartımı Kern (Germany) marka hassas terazî ile yapılmıştır.

Denemede kullanılan kimyasalların ve dokuların tartımı ise Shimadzu (Japan) marka ATX224R model hasas terazî ile gerçekleştirilmiştir.

e) Otomatik Pipet

Pipetleme işlemleri Gilson (USA) marka otomatik pipet seti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

f) Diseksiyon Malzemesi

Diseksiyon malzemesi olarak diseksiyon makası ve pens kullanılmıştır.

g) Ölçüm Tahtası

Deneme balıklarının boy ölçümünde Vernier Caliper model 0,05 mm hassasiyete sahip kumpas kullanılmıştır.

ğ) Soğutucu (-80)

Dokuların saklanması aşamasında Wisd (WITEG Labortechnik, Germany) marka soğutucudan yararlanılmıştır.

h) Santrifüj

Santrifüj işlemlerinde Hettich marka Mikro 200R model cihaz kullanılmıştır.

ı) Saf Su Cihazı

Su kalite analizlerinin yapılması aşamasında, Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü Ekofizyoloji Laboratuvarı'nda bulunan ve genel amaçlar için kullanılan saf su cihazından yararlanılmıştır.

i) Homojenizatör

Dokuların homojenizasyon işleminde ISOLAB marka homojenizatör kullanılmıştır.

j) Otomatik Analizatör

Enzim aktivite analizlerinin yürütülmesinde Otto Scientific marka, MINDRAY-BS400 model cihaz kullanılmıştır.

k) İnkübatör

İnkübasyon işleminde Elabscience marka, E-EL-H1470 model inkübasyon cihazı kullanılmıştır.

l) Sarf Malzemeleri

Denemede çeşitli ebatlarda ve sayıda erlenmayer, beher, piset, santrifüj tüpü, tartım kabı, parafilm gibi laboratuara ilişkin sarf malzemesi kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Deneme süresi ve uygulama planı

Denemenin ilk basamağı olarak deneme balıkları LNG' nin iki farklı dozuna (düşük; 0,312 µg/L, yüksek; 6,24 µg/L) (Contardo-Jara vd., 2011) 24, 48 ve 96 saat (Keramati vd., 2010) süre ile maruz bırakılmışlardır. Bu aşamada, akut deneylerden statik biyodeney yöntemi uygulanarak deneyler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir. Her bir akvaryuma boy ve ağırlıkları belirlenen, tesadüfi olarak seçilen ve biyodeneylede kullanılan standart yöntemlerde (OECD, 1992., TSE, 1988., 1990) belirtilen balık sayısı göz önünde bulundurularak 20 adet balık konulmuştur. Deneme balıkları 15 gün boyunca deneme akvaryumlarında adaptasyon süreci geçirmiş, deney başlamadan 24 saat önce yemleme kesilerek balıkların sindirim sisteminin boş olması sağlanmıştır.

Denemenin ikinci aşamasında, biyodeney gerçekleştirildikten sonra deneme gruplarına ait balıklardan elde edilen örneklerde, antioksidan enzim aktivitesi; SOD, CAT, GPx ve lipid peroksidasyon düzeyi ise MDA değeri ile belirlenmiştir.

3.2.1.1 Etik izin

Deneme balıkları için Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' ndan 01.07.2020 tarih ve 2020-12-108 karar no ile tüm gerekli izinler alınmıştır.

3.2.2 Antioksidan enzim aktivitesine ilişkin analizler

3.2.2.1 Doku örneklerinin hazırlanması

LNG' nin farklı doz ve sürelerdeki etkilerini incelemek amacı ile her deneme grubuna ait akvaryumdan 20 adet balık disekte edilerek, enzim aktivite ölçümleri için kas ve karaciğer doku örnekleri toplanmıştır. Bireysel doku ağırlıkları yapılan analizler için yeterli olmadığından her bir deneme grubunda paçal örnekleme gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri 2 ml hacime sahip eppendorf tüplerin içine alınmış, tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak örneklerin kuruması engellenmiş ve analizler gerçekleştirilene kadar -80°C ' de muhafaza edilmiştir.

İşlem Basamakları;

- -80°C ' de muhafaza edilen kas ve karaciğer dokularına ait örneklerin oda sıcaklığında (20°C) 5-15 dk. içinde çözünmeleri sağlanmıştır.
- Çözdürülen doku örnekleri 0,1 g ağırlığında hassas terazide tartılarak 900 ml tampon çözelti (140 mmol KCl) içine eklenmiştir.
- Her bir doku tüpü, buzun içinde homojenizatör yardımıyla homojen hale getirilmiştir.
- Homojenizasyon işleminden sonra her bir analiz için süpernatant kısmından 50 μl alınarak başka bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.
- Örnekler santrifüj tüplerine alınarak 7000 rpm' de 5 dakika $+4^{\circ}\text{C}$ ' de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası her bir parametre için enzim aktivite değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.4 Doku örnekleri

3.2.2.2 Süperoksit dismutaz (SOD)

Kör ve örnek küvetine kimyasallar eklendikten sonra 560 nm' de aktivite ölçülmüştür (Çizelge 3.2) (Bayır 2005).

Çizelge 3.2 Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Fosfat Tamponu	310	310
NBT	300	300
Na₂CO₃	200	200
Sığır Albumin	100	100
Ksantin	40	40
Hemolizat	-	30
Distile Su	30	-
Ksantin Oksidaz	20	20
Oda Sıcaklığında (20°C) 20 dk. inkübasyon		
CuCl₂	500	500

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(Kör \text{ absorbans} - Örnek \text{ absorbans}) / (Kör \text{ absorbans})] \times 100$$

$$EU/ml = \% \text{ İnhibisyon} / 50 \times 0,1$$

3.2.2.3 Katalaz (CAT)

Kör ve örnek küvetine kimyasallar eklendikten sonra 3 dk boyunca 230 nm' de 1 dk' daki köre karşı aktivite ölçülmüştür (Çizelge 3.3) (Beutler 1984).

Çizelge 3.3 Katalaz (CAT) enzim aktivite ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Fosfat Tamponu	2990	-
H ₂ O ₂	10	2990
Hemolizat	-	10

$$EU/ml = (\Delta A \times V_T) / (E \times V_H)$$

ΔA : Absorbans farkı

V_T : Deney çözeltisinin toplam hacmi (ml)

V_H : Deneyde örnek olarak kullanılan süpernatantın hacmi (ml)

E : Ekstinsiyon katsayısı (1nmol H₂O₂' nin oluşturduğu absorbans değeri; 0,071)

3.2.2.4 Glutatyon peroksidaz (GPx)

Kör ve örnek küvetine kimyasallar eklendikten sonra NADPH oksidasyonunu takiben 340 nm' de aktivite (düşüş hesaplanarak) ölçülmüştür (Çizelge 3.4) (Beutler 1984).

Çizelge 3.4 Glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivite ölçümü

	Kör (µl)	Örnek (µl)
Tris-EDTA	100	100
GSH	20	20
Glutatyon redüktaz	100	100
NADPH	100	100
Hemolizat	10	10
Distile Su	670	660
Ksantin Oksidaz	20	20
37°C' de 10 dk. inkübasyon		
t-butilhidroperoksit	-	10

$$EU/ml = (\Delta A / E) \times (V_T / V_H)$$

ΔA : Absorbans farkı

V_T : Deney çözeltisinin toplam hacmi (ml)

V_H : Deneyde örnek olarak kullanılan süpernatantın hacmi (ml)

E : Ekstinsiyon katsayısı (1nmol NADPH' ın oluşturduğu absorbans değeri; 6,22)

3.2.3 Lipid peroksidasyonuna ilişkin analizler

3.2.3.1 Malondialdehit (MDA)

Lipid peroksidasyonunu belirlemek için örnek küvetine kimyasallar eklendikten sonra 532 nm' de ölçüm yapılmıştır (Çizelge 3.5) (Placer vd., 1966).

Çizelge 3.5 Malondialdehit (MDA/TBARs) değerinin ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)	Standart (ml)
% 10 TCA (Renk ayırıcı)	2,25	2,25	2,25
% 0,8 TBA (Renk ayırıcı)			
1,1,3,3 Tetraetoxipropan (TEP)	-	-	0,25
Serum fizyolojik	0,25	-	-
20 dk kaynatma (su banyosu)/soğutma			
3000 rpm 10 dk santrifüj			
MDA= (A _Ö / A _S) × K _S			
A _Ö : Örnek absorbansı			
A _S : Standart absorbansı			
K _S : Standart konsantrasyonu			

3.2.4 İstatistik Değerlendirme

Denemeden elde edilen gözlem değerleri varyansların homojenliği testine tabi tutulmuş ve veri grubuna en uygun test, deney gruplarında farklı zamanlarda (24, 48, 96 saat), farklı dokuların (kas ve karaciğer) karşılaştırılması adına Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi SPSS 26.0 İstatistik Paket Programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Antioksidan Enzim Aktivitesine İlişkin Bulgular

4.1.1 Süperoksit dismutaz (SOD)

Denemede kullanılan iki farklı LNG dozu (0,312 µg/L ve 6,24 µg/L) ve üç farklı deneme süresine (24, 48 ve 96 saat) ilişkin SOD analizine ait veriler Çizelge 4.1, Şekil 4.1 ve Çizelge 4.2 Şekil 4.2' de sunulmuştur. Ortalama değerler arasındaki farklılıklar Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4.1 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	SOD (EU/ml)
K	K _{0,05}	K _a -24	350,40 ± 32,95 ^a
	K ₁		218,10 ± 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	207,35 ± 64,42 ^a
	K ₁		166,60 ± 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	196,95 ± 127,21 ^a
	K ₁		141,40 ± 48,65 ^a
L _D		L _{Da} -24	200,50 ± 74,73 ^a
		L _{Db} -48	174,00 ± 106,74 ^a
		L _{Dc} -96	295,48 ± 147,30 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	263,28 ± 64,45 ^a
		L _{Yb} -48	269,95 ± 134,93 ^a
		L _{Yc} -96	381,58 ± 118,34 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

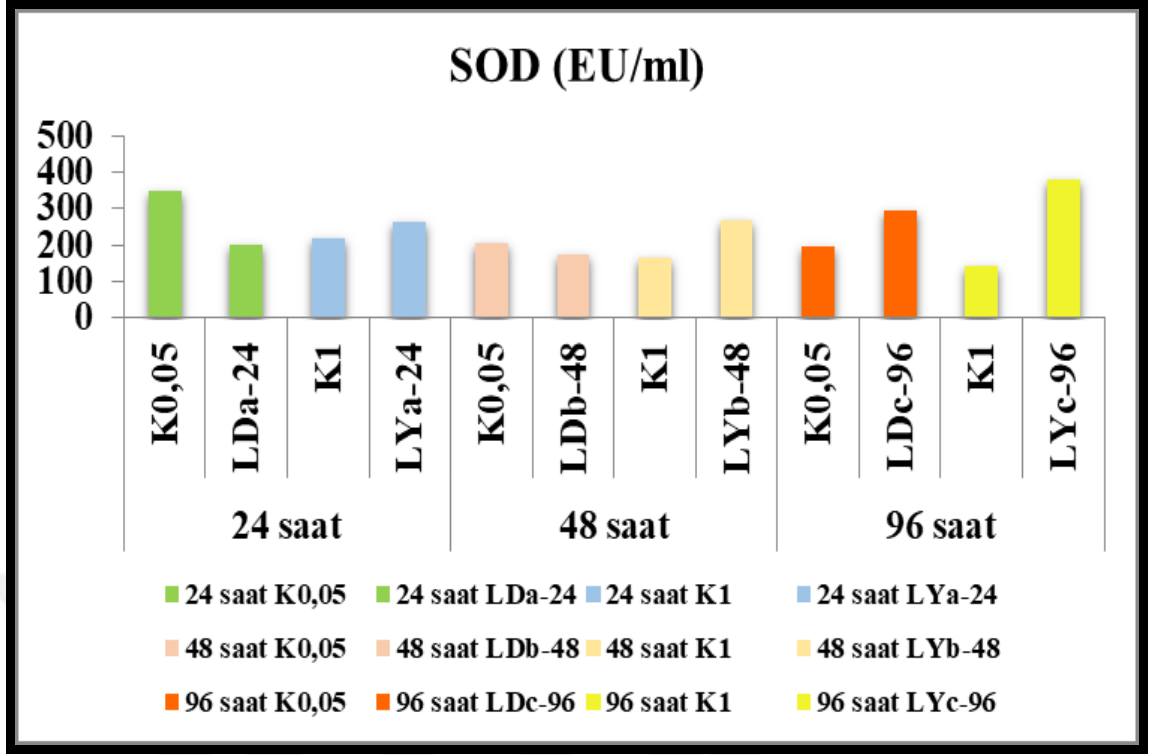
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96

: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96

Şekil 4.1 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında SOD değerlerinin kas dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu tespit edilen farklılıkların önemsiz ($p \leq 0,05$) olduğu belirlenmiştir.

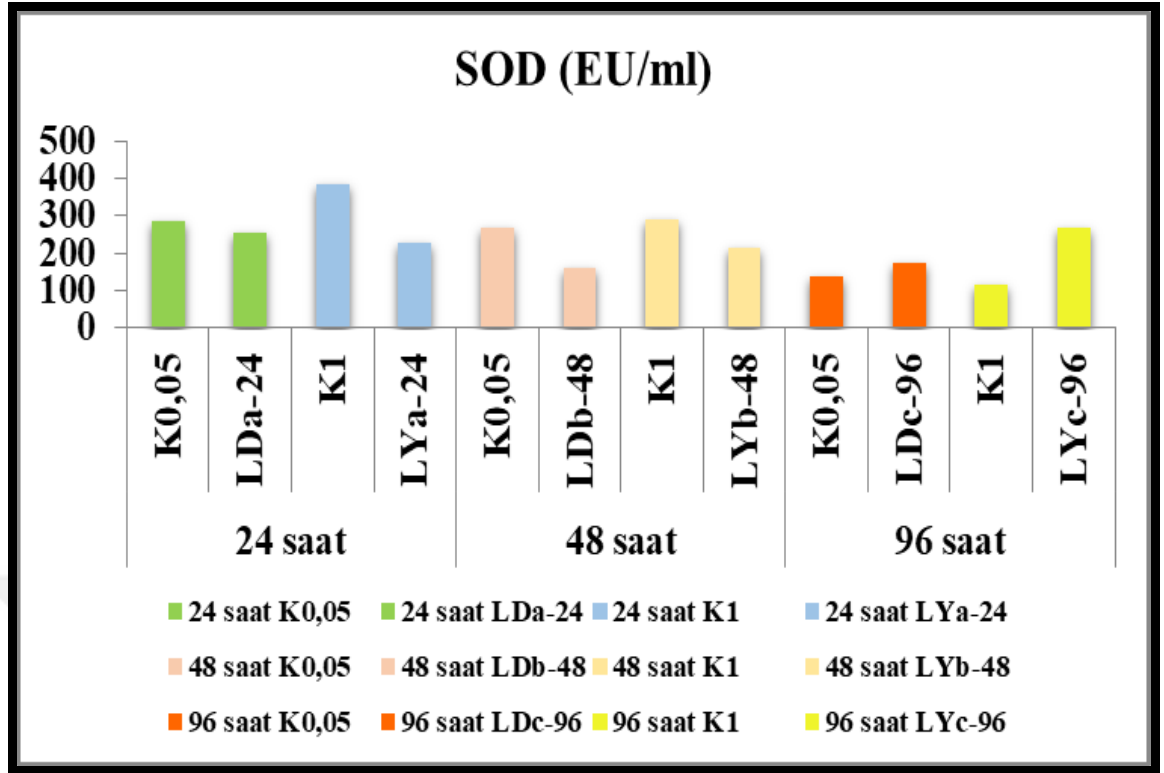
Kas dokusunda düşük doz uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarında SOD enzim aktivite değerlerinde azalma olduğu, ancak artan zamana bağlı olarak 96 saatlik deneme grubunda değerlerin yükseldiği gözlenmiştir. Yüksek doz uygulanan deneme grubunda ise tüm deneme gruplarında değerlerde artış olduğu gözlenmiştir. Düşük doz uygulanan grupta enzim aktivitesi değerleri 24, 48 ve 96 saatin sonunda sırasıyla, 200,50; 174,00 ve 295,48 EU/ml olarak ölçülmüş, yüksek doz uygulanan deneme grubunda ise 263,28; 269,95 ve 381,58 EU/ml olarak tespit edilmiştir. Yüksek doz uygulanan grupta zamana bağlı olarak düzenli bir artış söz konusudur.

Çizelge 4.2 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	SOD (EU/ml)
K	K_{0,05}	K_a-24	284,70 $\pm$ 158,39 ^a
	K₁		384,25 $\pm$ 17,61 ^a
	K_{0,05}	K_b-48	269,70 $\pm$ 29,13 ^a
	K₁		290,25 $\pm$ 58,19 ^a
	K_{0,05}	K_c-96	139,80 $\pm$ 23,76 ^a
	K₁		117,00 $\pm$ 56,00 ^a
L_D		L_{Da}-24	254,97 $\pm$ 138,01 ^a
		L_{Db}-48	161,70 $\pm$ 103,14
		L_{Dc}-96	173,15 $\pm$ 59,88 ^a
L_Y		L_{Ya}-24	229,07 $\pm$ 114,46 ^a
		L_{Yb}-48	214,77 $\pm$ 166,69 ^a
		L_{Yc}-96	267,55 $\pm$ 112,06 ^a

***K** (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)
L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96
: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96
: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96

Şekil 4.2 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin SOD analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında SOD değerlerinin karaciğer dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu tespit edilen farklılıkların önemsiz ($p \leq 0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Düşük doz ve yüksek doz uygulanan gruplar karaciğer dokusu açısından karşılaştırıldığında, 24 ve 48 saatlik uygulamaların SOD enzim aktivite değerlerinde düşüşe neden olduğu, ancak artan zamana bağlı olarak 96 saatlik uygulama grubunda enzim aktivite değerlerinin ise arttığı gözlenmiştir. Düşük doz uygulanan grupta ölçülen SOD enzim aktivitesi değerleri sırasıyla, 254,97; 161,7 ve 173,15 EU/ml iken, yüksek doz uygulanan grupta, 229,07; 214,77 ve 267,55 EU/ml olarak ölçülmüştür.

4.1.2 Katalaz (CAT)

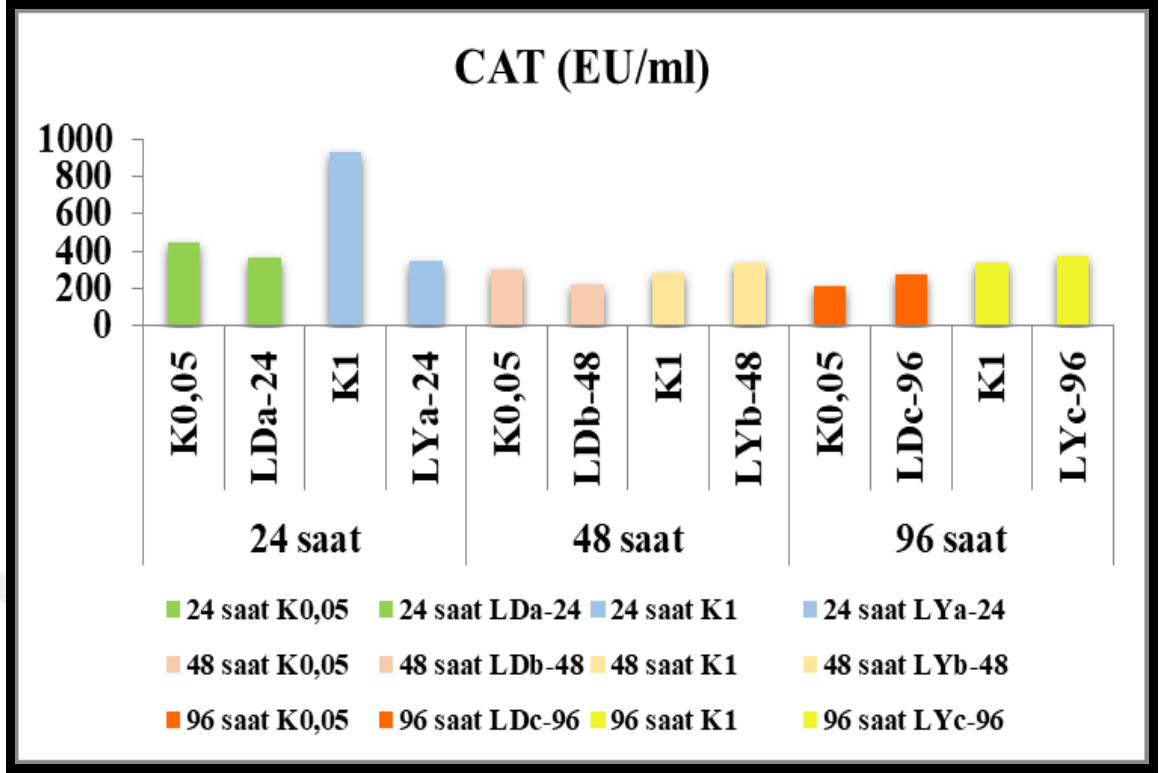
Denemede kullanılan iki farklı LNG dozu (0,312 µg/L ve 6,24 µg/L) ve üç farklı deneme süresine (24, 48 ve 96 saat) ilişkin CAT analizine ait veriler Çizelge 4.3, Şekil 4.3 ve Çizelge 4.4, Şekil 4.4' de sunulmuştur. Ortalama değerler arasındaki farklılıklar Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4.3 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin CAT analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	CAT (EU/ml)
K	K _{0,05}	K _a -24	442,00 $\pm$ 367,70 ^a
	K ₁		936,00 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	299,00 $\pm$ 91,92 ^a
	K ₁		286,00 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	208,00 $\pm$ 36,77 ^a
	K ₁		338,00 $\pm$ 220,62 ^a
L _D		L _{Da} -24	368,33 $\pm$ 206,31 ^a
		L _{Db} -48	218,40 $\pm$ 134,60 ^a
		L _{Dc} -96	277,33 $\pm$ 100,92 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	351,00 $\pm$ 134,35 ^a
		L _{Yb} -48	338,00 $\pm$ 146,16 ^a
		L _{Yc} -96	372,67 $\pm$ 169,83 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)
L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96
: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96
: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96

Şekil 4.3 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin CAT analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında CAT değerlerinin kas dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu tespit edilen farklılıkların önemsiz ($p \leq 0,05$) olduğu belirlenmiştir.

Kas dokusunda düşük doz uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik uygulama gruplarında CAT enzim aktivite değerlerinde azalma olduğu, ancak artan zamana bağlı olarak 96 saatlik deneme grubunda değerlerin yükseldiği gözlenmiştir. Yüksek doz uygulanan deneme grubunda ise 24 saatte enzim aktivite değerinin düştüğü, 48 ve 96 saatlik deneme gruplarında ise değerlerde bir artış olduğu gözlenmiştir. Düşük doz uygulanan grupta enzim aktivitesi değerleri 24, 48 ve 96 saatin sonunda sırasıyla, 368,33; 218,40 ve 277,33 EU/ml olarak ölçülmüş, yüksek doz uygulanan deneme grubunda ise 351,00; 338,00 ve 372,67 EU/ml olarak tespit

edilmiştir. Düşük doz uygulanan grupta zamana bağlı olarak düzenli bir azalma söz konusudur.

Çizelge 4.4 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin CAT analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	CAT (EU/ml)
K	K _{0,05}	K _a -24	169,00 $\pm$ 91,92 ^a
	K ₁		351,00 $\pm$ 349,31 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	897,00 $\pm$ 349,31 ^a
	K ₁		1079,00 $\pm$ 91,920 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	195,00 $\pm$ 239,00 ^a
	K ₁		429,00 $\pm$ 91,92 ^a
L _D		L _{Da} -24	359,67 $\pm$ 263,83 ^a
		L _{Db} -48	442,00 $\pm$ 298,72 ^a
		L _{Dc} -96	641,33 $\pm$ 393,51 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	333,67 $\pm$ 162,30 ^a
		L _{Yb} -48	453,14 $\pm$ 321,20 ^a
		L _{Yc} -96	398,67 $\pm$ 276,95 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

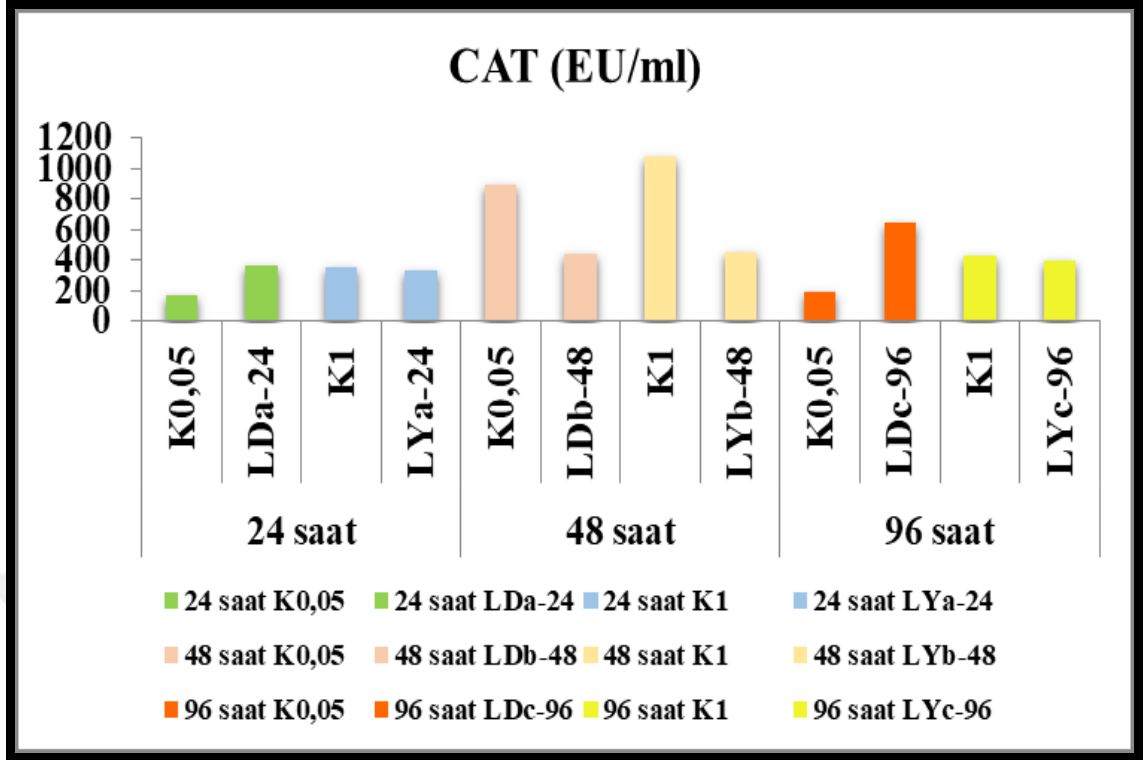
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96

: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96

Şekil 4.4 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin CAT analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.4 ve Şekil 4.4 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında CAT değerlerinin kas ve karaciğer dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu $p \leq 0,05'$ e (önem derecesine) göre tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Karaciğer dokusunda düşük doz uygulanan grupta 24, 48 ve 96 saatlik zamana bağlı değişim sırasıyla, 359,67; 442,00 ve 641,33 EU/ml olarak artış göstermiştir. Yüksek doz uygulanan grupta ise 333,67, 453,14 ve 398,67 EU/ml olarak ölçülmüştür. Değerler, yüksek doz uygulanan grupta zamana bağlı olarak düzenli azalma göstermiştir. Düşük doz uygulanan grupta ise 24 saatin sonunda enzim aktivitesinin arttığı, ancak zamana bağlı olarak 48 saatlik grupta enzim aktivitesinin azaldığı, 96 saatlik grupta ise yine artış meydana geldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, deneme gruplarında CAT enzim aktivite değerleri, özellikle de düşük doz uygulanan balıklarda değişkenlik göstermektedir.

4.1.3 Glutatyon peroksidaz (GPx)

Denemede kullanılan iki farklı LNG dozu (0,312 µg/L ve 6,24 µg/L) ve üç farklı deneme süresine (24, 48 ve 96 saat) ilişkin GPx analizine ait veriler Çizelge 4.5, Şekil 4.5 ve Çizelge 4.6, Şekil 4.6' da sunulmuştur. Ortalama değerler arasındaki farklılıklar Nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4.5 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin GPx analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	GPx (EU/ml)
K	K _{0,05}	K _a -24	355,50 $\pm$ 19,09 ^a
	K ₁		336,00 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	368,00 $\pm$ 46,67 ^a
	K ₁		424,00 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	453,00 $\pm$ 53,74 ^a
	K ₁		423,50 $\pm$ 95,46 ^a
L _D		L _{Da} -24	430,17 $\pm$ 158,51 ^a
		L _{Db} -48	374,20 $\pm$ 62,41 ^a
		L _{Dc} -96	424,83 $\pm$ 85,05 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	402,17 $\pm$ 126,08 ^a
		L _{Yb} -48	362,00 $\pm$ 52,83 ^a
		L _{Yc} -96	515,83 $\pm$ 153,84 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

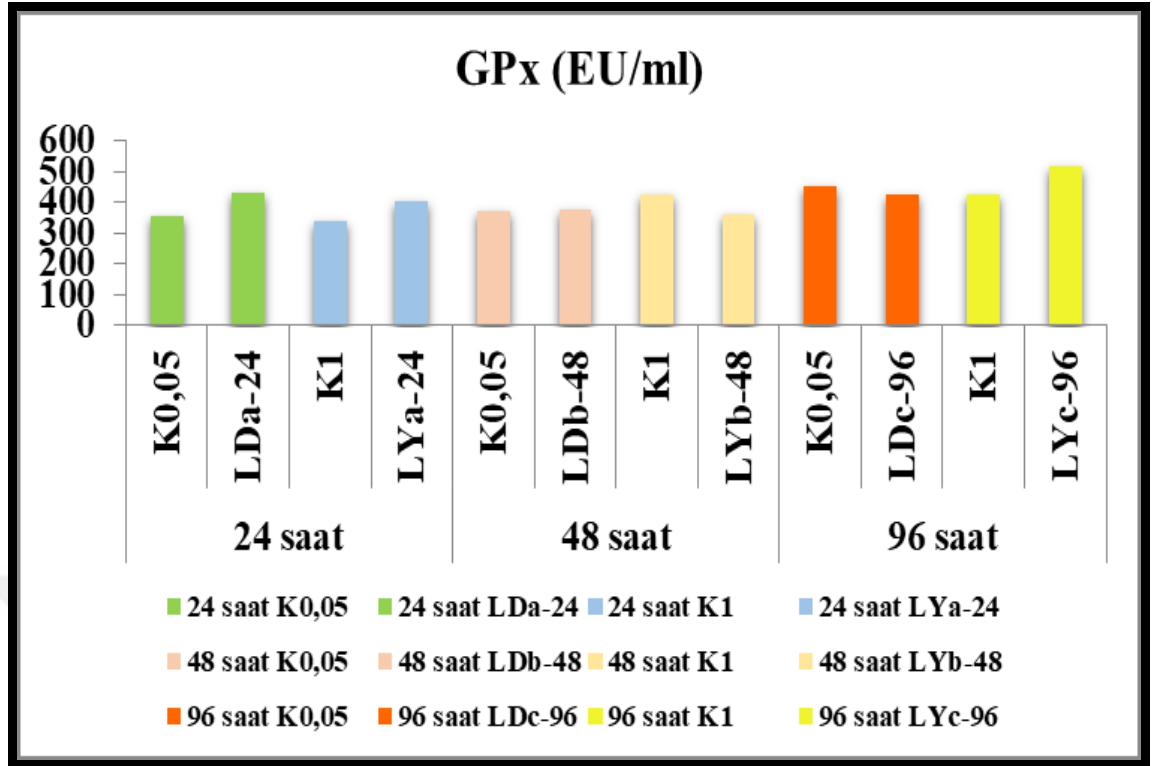
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96

: L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 LD (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : LD_a -24, LD_b -48, LD_c -96
 LY (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : LY_a -24, LY_b -48, LY_c -96

Şekil 4.5 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin GPx analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında GPx değerlerinin kas dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu $p \leq 0,05'$ e (önem derecesine) göre tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Kas dokusunda düşük doz ve yüksek doz uygulanan gruplar, kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında 24 saatlik deneme sonunda GPx enzim aktivitesinde yükselme olduğu, ancak artan zamana bağlı olarak 48 saatlik deneme sonunda düşük doz uygulanan grupta enzim aktivitesinin arttığı, yüksek doz uygulanan grupta ise azaldığı gözlenmiştir. Düşük doz uygulanan 96 saatlik deneme grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GPx değerleri açısından bir azalma tespit edilirken, yüksek doz uygulanan grupta artış belirlenmiştir. Düşük doz uygulanan grupta zamana bağlı değişim, 24, 48 ve 96 saat olarak sırasıyla, 430,17; 374,20 ve 424,83 EU/ml olarak,

yüksek doz uygulanan grupta ise sırasıyla, 402,17; 362,00 ve 515,83 EU/ml olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.6 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin GPx analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	GPx (EU/ml)
K	K _{0,05}	K _a -24	475,00 $\pm$ 18,38 ^a
	K ₁		619,50 $\pm$ 222,74 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	674,00 $\pm$ 123,04 ^a
	K ₁		684,00 $\pm$ 108,89 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	881,68 $\pm$ 587,00 ^a
	K ₁		584,00 $\pm$ 4,24 ^a
L _D		L _{Da} -24	561,33 $\pm$ 76,44 ^a
		L _{Db} -48	552,83 $\pm$ 83,97 ^a
		L _{Dc} -96	910,15 $\pm$ 400,00 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	632,17 $\pm$ 197,04 ^a
		L _{Yb} -48	543,14 $\pm$ 99,99 ^a
		L _{Yc} -96	1055,81 $\pm$ 460,00 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

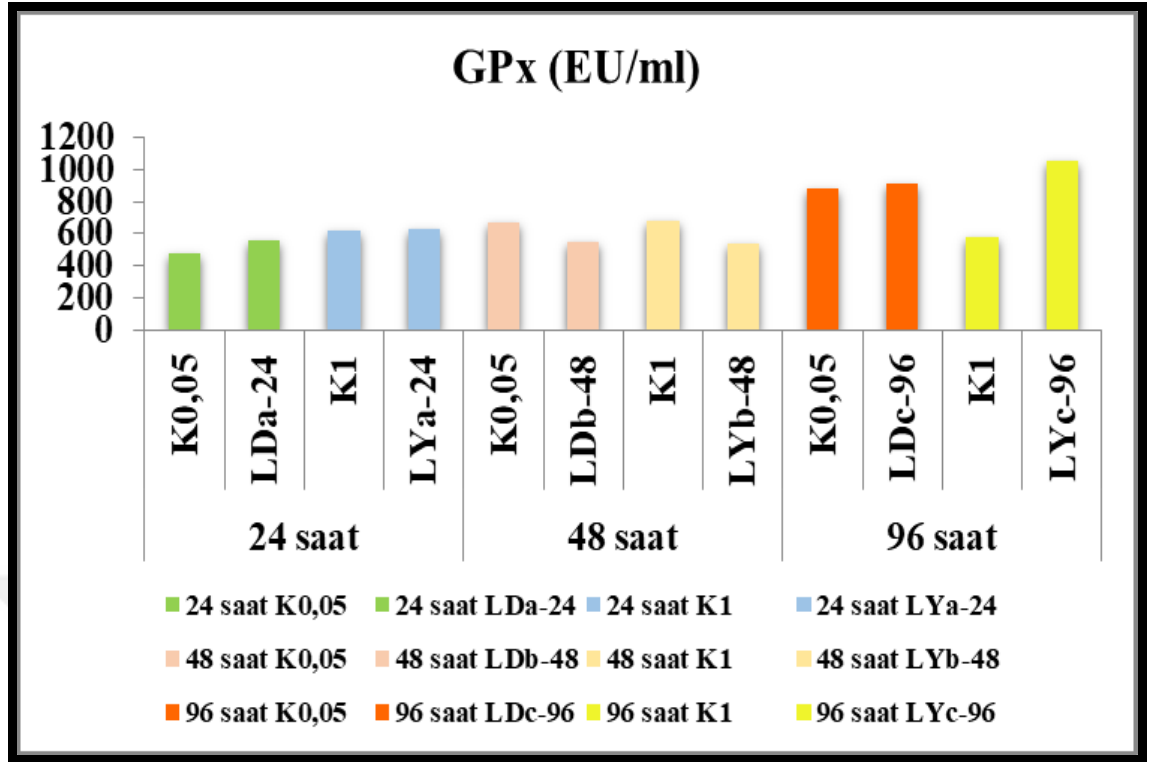
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 μ g/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 μ g/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96

: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96

Şekil 4.6 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin GPx analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.6 ve Şekil 4.6 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında GPx değerlerinin karaciğer dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu $p \leq 0,05'$ e (önem derecesine) göre tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Karaciğer dokusunda hem düşük hem de yüksek doz uygulanan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 96 saatlik deneme gruplarında, GPx enzim aktivite değerlerinde artış olduğu, bununla beraber 48 saatlik deneme grubunda değerlerin azaldığı gözlenmiştir. Düşük doz enzim uygulanan grupta zaman bağlı değişim 24, 48 ve 96 saat sonunda sırasıyla, 561,33; 552,83 ve 910,15 EU/ml olarak ölçülmüştür. Yüksek doz enzim uygulanan grupta ise zaman bağlı değişim 24, 48 ve 96 saat sonunda sırasıyla 632,17; 543,14 ve 1055,81 EU/ml olarak belirlenmiştir.

4.3 Lipid Peroksidasyonuna İlişkin Bulgular

4.3.1 Malondialdehit (MDA)

Denemede kullanılan iki farklı LNG dozu (0,312 µg/L ve 6,24 µg/L) ve üç farklı deneme süresine (24, 48 ve 96 saat) ilişkin MDA analizine ait veriler Çizelge 4.7, Şekil 4.7 ve Çizelge 4.8, Şekil 4.8' de sunulmuştur. Ortalama değerler arasındaki farklılıklar Nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi ile istatistik olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4.7 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin MDA analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	MDA (nmol/g)
K	K _{0,05}	K _a -24	23,10 $\pm$ 2,62 ^a
	K ₁		14,61 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	13,03 $\pm$ 4,96 ^a
	K ₁		23,42 $\pm$ 0,00 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	12,44 $\pm$ 6,25 ^a
	K ₁		22,81 $\pm$ 20,92 ^a
L _D		L _{Da} -24	10,19 $\pm$ 7,34 ^a
		L _{Db} -48	33,11 $\pm$ 18,64 ^a
		L _{Dc} -96	16,01 $\pm$ 13,61 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	22,15 $\pm$ 10,18 ^a
		L _{Yb} -48	20,04 $\pm$ 4,57 ^a
		L _{Yc} -96	15,93 $\pm$ 15,74 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

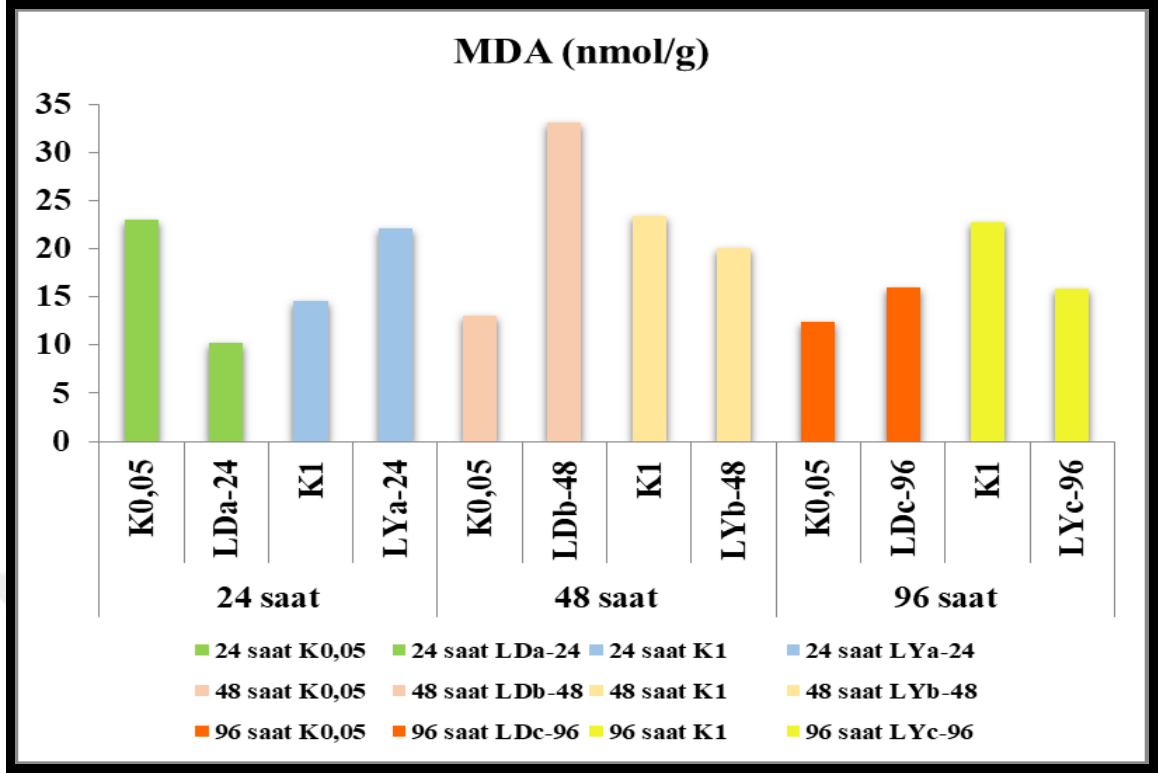
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96

: L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96

Şekil 4.7 Deneme gruplarında kas dokusuna ilişkin MDA analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında MDA değerlerinin kas dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu $p \leq 0,05$ ' e (önem derecesine) göre tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Kas dokusunda düşük doz uygulanan grup, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 24 saatin sonunda MDA enzim aktivitesinde azalma olduğu, ancak artan zamana bağlı olarak 48 ve 96 saatin sonunda ise değerlerin arttığı gözlenmiştir. Yüksek doz uygulanan grupta ise enzim aktivitesinin 24 saatlik zaman diliminde arttığı, ancak 48 ve 96 saatlik deneme gruplarında ise azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre düşük ve yüksek doz MDA değerleri zamana bağlı olarak tam ters bir eğilim göstermiştir. Düşük doz uygulanan grupta zamana bağlı değişim sırasıyla 24, 48 ve 96 saat olmak üzere, 10,19; 33,11 ve 16,01 nmol/g olarak ölçülmüş, yüksek doz uygulanan

grupta ise zamana bağılı değişimin sırasıyla 22,15; 20,04 ve 15,93 nmol/g olarak düzenli bir azalma gösterdiği görülmüştür.

Çizelge 4.8 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin MDA analiz değerleri (Ortalama $\pm$ Standart sapma) ($n=3$)

Deneme Grupları*		Deneme süresi (saat)	MDA (nmol/g)
K	K _{0,05}	K _a -24	42,89 $\pm$ 36,78 ^a
	K ₁		13,98 $\pm$ 4,11 ^a
	K _{0,05}	K _b -48	10,20 $\pm$ 3,49 ^a
	K ₁		21,29 $\pm$ 19,18 ^a
	K _{0,05}	K _c -96	24,82 $\pm$ 13,79 ^a
	K ₁		17,21 $\pm$ 3,02 ^a
L _D		L _{Da} -24	20,58 $\pm$ 7,88 ^a
		L _{Db} -48	8,84 $\pm$ 2,66 ^a
		L _{Dc} -96	10,26 $\pm$ 3,92 ^a
L _Y		L _{Ya} -24	12,35 $\pm$ 8,61 ^a
		L _{Yb} -48	17,54 $\pm$ 17,09 ^a
		L _{Yc} -96	17,24 $\pm$ 16,09 ^a

*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren)

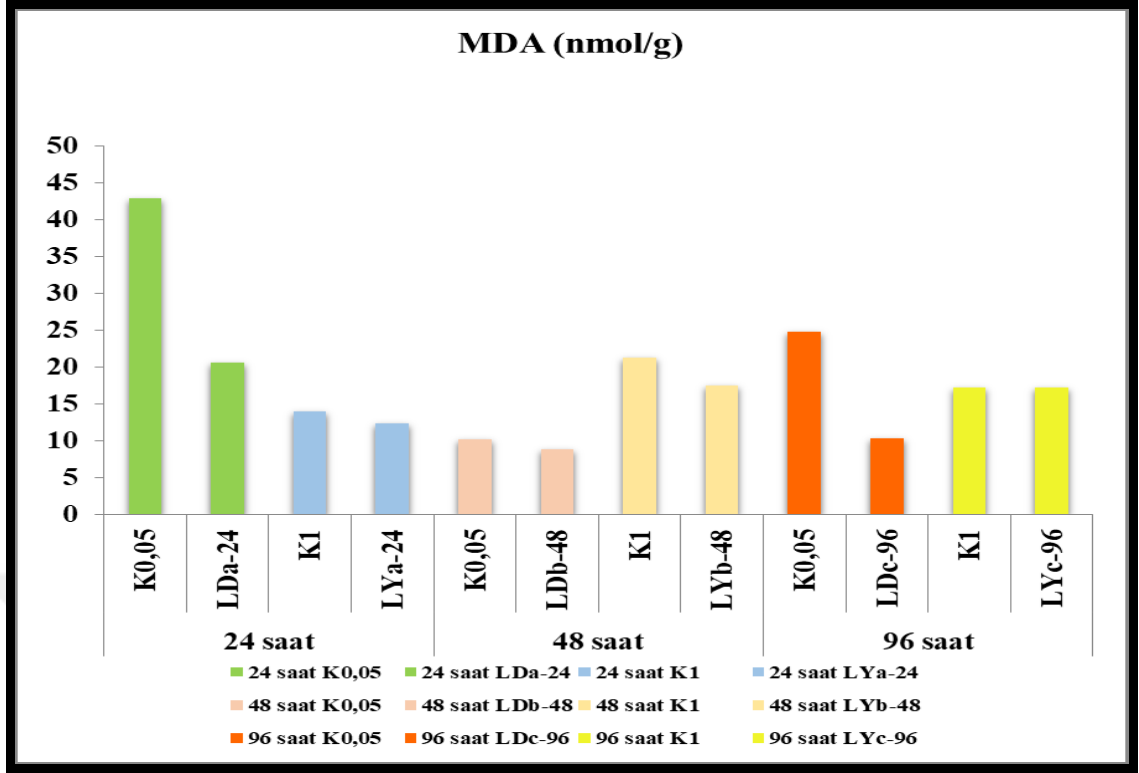
L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L)

L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L)

: K_a-24, K_b-48, K_c-96

: L_{Da} -24, L_{Db} -48, L_{Dc} -96

: L_{Ya} -24, L_{Yb} -48, L_{Yc} -96



*K (K_{0,05}: 0,05ml Çözgen Madde İçeren, K₁: 1ml Çözgen Madde İçeren) : K_a-24, K_b-48, K_c-96
 L_D (Levonorgestrel Düşük Doz - 0,312 µg/L) : L_{Da}-24, L_{Db}-48, L_{Dc}-96
 L_Y (Levonorgestrel Yüksek Doz - 6,24 µg/L) : L_{Ya}-24, L_{Yb}-48, L_{Yc}-96

Şekil 4.8 Deneme gruplarında karaciğer dokusuna ilişkin MDA analiz değerleri (Ortalama ± Standart sapma) (n=3)

Çizelge 4.8 ve Şekil 4.8 incelendiğinde, tüm deneme gruplarında MDA değerlerinin karaciğer dokusunda farklı sürelerle bağlı olarak LNG doz uygulamasından etkilendiği ancak istatistik olarak yapılan değerlendirme sonucu $p \leq 0,05'$ e (önem derecesine) göre tespit edilen farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir.

Karaciğer dokusunda düşük ve yüksek doz uygulanan tüm deneme gruplarında, MDA değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değerlerin düştüğü tespit edilmiştir. Düşük doz uygulanan grupta enzim aktivitesi 24, 48 ve 96 saatin sonunda sırayla, 20,58; 8,84 ve 10,26 nmol/g olarak, yüksek doz uygulanan grupta ise, 12,35; 17,54 ve 17,24 nmol/g olarak saptanmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu araştırmada, kullanımı yaygın çevresel bir kirletici olan LNG' nin Zebra balıklarında (*Danio rerio*) antioksidatif savunma sistemi üzerine olan etkileri farklı doz (0,312 µg/L ve 6,24 µg/L) ve sürelerde (24, 48, 96 saat) kas ve karaciğer dokusu üzerinden incelenmiş ve elde edilen sonuçlar istatistik olarak değerlendirilmiştir. İstatistik olarak yapılan değerlendirmede doz ve süre bakımından deneme grupları arasında tespit edilen farklılıklar önemsiz ($p \leq 0,05$) olarak belirlense de, incelenen parametreler (SOD, CAT, GPx, MDA) açısından uygulanan doza ve süreye bağlı olarak değişim belirlenmiştir.

5.1 Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, yüksek doz LNG (6,24 µg/L) uygulamasının artan zamanla SOD enzim aktivite değeri üzerinde etkili olup, her iki doku açısından da değerlerde artışa neden olduğu, bu bağlamda LNG uygulamasının oluşturduğu oksidatif stresin SOD aktivitesini etkilediği ifade edilebilir. Bu verilerle uyumlu olarak, pestisit gibi farklı tipte olan EBK' ların da sucul organizmalar üzerinde SOD enzim aktivite değerlerinde inhibisyona neden olduğu bildirilmiştir. Li vd., (2010), gökkuşağı alabalığında, Propiconazole (PCZ)' nin farklı doz uygulamalarının SOD değerlerinde inhibisyona neden olduğunu ve ciddi oksidatif hasarlara yol açtığını; benzer şekilde Santos ve Martinez (2012)' in Atrazinin neotropikal bir balık türü olan *Prochilodus lineatus*' ta akut etkisini değerlendirdikleri çalışmada, bu herbisit SOD değerlerinde azalma yarattığı; bir çift kabuklu türü (*Ruditapes decussatus*) ile yapılan bir diğer çalışmada ise SOD aktivite değerinin, oksidatif stres belirgin bir şekilde tespit edilmesine rağmen LNG uygulamasından (1000 ng/L) etkilenmediği bildirilmiştir (Mannai vd., 2021). Balık ve çift kabuklu ile yapılan çalışmalar üzerine olan bulgular, araştırmamızın bulguları ile uygunluk göstermektedir.

5.2 Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Bu araştırmada, CAT enzim aktivitesinin yüksek ve düşük doz uygulanan gruplardan elde edilen değerler açısından değişkenlik gösterdiği, farklı bir sentetik progestin çeşidi olan NET' e maruz bırakılan deniz medeka (*Oryzias melastigma*) balıklarında CAT aktivite değerlerinin arttığı (Dong vd., 2023), yine NGT (0,10 ve 1000 ng/L) uygulamasının 21 günlük deneme sonunda CAT seviyelerinde azalmaya neden olduğu (Zhao vd., 2023), benzer şekilde bu araştırmada da deney organizması olarak kullanılan Zebra balığında 1000 ng/L LNG ve 500 ng/L Noretindrone' a maruz kalmanın CAT seviyesinde düşüş yarattığı (Cardoso vd., 2019; Wang vd., 2021) bildirilmiştir. Bu açıdan farklı gestajen uygulamalarının bu tez çalışmasında da olduğu gibi CAT enzim aktivite değerlerinde dalgalanmalara neden olduğu, oluşan oksidatif stresin bu parametre açısından artış/azalma olarak kendini gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Mannai vd. (2021) çift kabuklu (*Ruditapes decussatus*) türünde yaptıkları çalışmada ise, 1000 ng/L LNG' ye maruz kalmanın oluşturduğu oksidatif stresin bir göstergesi olarak CAT değerlerinde önemli bir artış olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada tespit edilen diğer parametrelerden SOD değerinde artış gözlenmezken, CAT aktivitesinde görülen yüksek değerlerin bu araştırmada da olduğu gibi CAT enzim aktivitesinin dalgalı bir seyir göstermesine bağlanabilir.

PCZ' nin farklı doz (0,2; 50 ve 500 µg/L) akut ve kronik uygulamalarının *Oncorhynchus mykiss* CAT aktivitesinde akut stres için adaptasyonla yanıt bulduğu, kronik stresin ise değerinde azalmaya neden olduğu (Li vd., 2010), kıızılgöz balığı ile yapılan bir diğer pestisit çalışmasında (Keramati vd., 2010) CAT aktivitesinin 24 saat sonunda artış gösterdiği, 48 ve 96 saatlerde ise azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler ile araştırmamızın bulguları birbirlerini destekler niteliktedir. Daha önce yapılan çalışmalar ve bu araştırmanın bulguları göz önünde bulundurulduğunda CAT enzim aktivite değerlerinin uygulamalardan ve süreden bağımsız olarak değişkenlik göstermesi bu tür çalışmaların kinetik çalışmalar olması şeklinde yorumlanabilir.

5.3 Glutasyon Peroksidaz (GPx) Enzim Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Bu tez çalışmasında, yüksek doz LNG uygulamasının her iki dokuda da yüksek GPx enzim aktivite değerlerine neden olduğu, bulgularımızla uyumlu şekilde NET' e (91,31 ng/L) maruz bırakılan deniz medeka (*Oryzias melastigma*) balığında GPx aktivitesinin arttığı (Dong vd., 2023), ancak Zebra balığı ile yapılan ve LNG ile Noretindrone uygulamasının GPx seviyesinde azalmaya neden olduğu (Cardoso vd., 2019; Wang vd., 2021), yine NGT uygulamasının kabuklu türlerinden *Mactra veneriformis*' te GPx seviyelerinde düşüş yarattığı bildirilmiştir (Zhao vd., 2023). Bu bağlamda progesteronların antioksidan savunmayı zayıflattığı vurgulanmıştır (Cardoso vd., 2019; Wang vd., 2021). Aynı gestajen maruziyetlerinde olduğu gibi pestisit maruziyetlerinde de GPx değerlerinde azalma gözlenmiştir (Li vd., 2010).

5.4 Malondialdehit (MDA) Aktivitesine İlişkin Bulguların Değerlendirilmesi

Oksidatif hasarın belirlenmesinde iyi bir indikatör olan MDA değerlerinin LNG doz uygulamasından etkilendiği ve bu çalışmada incelenen farklı dokular açısından, karaciğer dokusunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu araştırmanın verileriyle paralel olarak NET' e maruz bırakılan deniz medeka (*Oryzias melastigma*) balıklarında MDA aktivitesinin artışıyla oksidatif hasar meydana geldiği (Dong vd., 2023), *Ruditapes decussatus* türünde ölçülen TBARs değerinin 1000 ng/L LNG uygulamasından oksidatif stresin artışına bağlı olarak yükseldiği tespit edilmiştir (Mannai vd., 2021).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında;

- Süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen ve antioksidan sistemin en önemli öğelerinden biri olan SOD enzim aktivite değeri örneklenen dokular karşılaştırıldığında en yüksek karaciğer dokusunda 384,25 EU/ml olarak 24 saatlik kontrol grubunda gözlenirken, kas dokuda ise en yüksek değer 381,55 EU/ml olarak 96 saatlik yüksek doza maruz bırakılan

uygulama grubunda görülmüştür. En düşük değer ise karaciğer dokusunda 117,00 EU/ml olarak 96 saatlik uygulamaya ait kontrol grubunda tespit edilmiş, yine benzer şekilde 141,40 EU/ml aktivite değeri ile kas dokuda belirlenmiştir, yüksek doz uygulamasının artan zamanla SOD enzim aktivite değeri üzerinde etkili olup her iki doku açısından da değerlerde artışa neden olduğu,

- Mitokondriden sitoplazmaya gelen H_2O_2 ' nin detoksifikasyonunu sağlayan CAT enzim aktivite değerleri örneklenen kas ve karaciğer dokusu açısından değerlendirildiğinde, düşük doz uygulanan grupta kas dokusuna ait örneklerde 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde zamana bağlı olarak azalma, 96 saatlik sürede ise artış görüldüğü, karaciğer dokusunda ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük doz uygulanan gruplarda 24 saatlik deneme gruplarında azalma, 48 ve 96 saatlik deneme gruplarında artış görüldüğü, yüksek doz uygulamasında ise düzenli bir düşüş görüldüğü, özellikle düşük doz uygulanan gruplardan elde edilen değerlerin değişkenlik gösterdiği,
- Hücrede H_2O_2 ' nin temizlenmesini sağlayan enzimlerden biri olan GPx' e ait bu denemeye ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde, kas dokusunda en yüksek değer 515,83 EU/ml olarak 96 saatlik yüksek doz uygulama grubundan elde edilmiş, karaciğer dokusunda da yine en yüksek değer olan 1055,81 EU/ml aynı deneme grubunda saptanmıştır, yüksek doz LNG uygulamasının özellikle karaciğer dokusunda yüksek enzim aktivite değerlerine neden olduğu,
- MDA analizi ölçüm sonuçlarına göre, en düşük değerlerin 24 ve 48 saatlik LNG uygulama ve kontrol gruplarında saptandığı, 96 saatlik uygulama gruplarında ise kas dokusunda düşük doz uygulamasına ait değerlerde artış, bununla beraber yüksek doz uygulamasında ise azalma tespit edilmiştir. Karaciğer dokusunda ise düşük doz LNG uygulamasının kas dokusu ile karşılaştırıldığında azalmaya neden olduğu, yüksek dozda ise benzer değerlerin görüldüğü, karaciğer dokusunun LNG uygulamasına kas dokusuna göre daha duyarlı ve oksidatif stres için iyi bir indikatör olduğu,

tespit edilmiştir.

Bu bağlamda, enzim aktivite değerleri, incelenen tüm parametreler açısından istatistik olarak önemli bir farklılık sunmamıştır. Ancak, gruplar arasındaki farklılıklar

azımsanmayacak düzeydedir. LNG uygulamasının özellikle yüksek dozlarda ve artan sürelerde denenmesinin, balık metabolizmasında oksidatif stres yaratarak farklı sonuçlar oluşturduğu belirlenmiştir. Bu açıdan, LNG' nin balık üzerindeki etkilerinin ne şekilde geliştiğine dönük araştırma sorusunun cevaplanması mümkün olmuştur, alanında ilk çalışma olan bu araştırma sonuçlarının daha sonra yapılacak özellikle gestajen maruziyetinin hedef dışı türlerde oluşturacağı etkileri aydınlayabilecek çalışmalara bir referans kaynak olabileceği düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Anonim, 2009. Web Sitesi: <http://tr.wikipedia.org/wiki/Antioksidan> Erişim Tarihi: 18.08.2020.
- Anonim, 2011. Web Sitesi: http://ahmettutar.com/all_upload/image/humikasit.pdf Erişim Tarihi: 18.08.2020.
- Anonim. 2017. Web Sitesi: <http://cdn.istanbul.edu.tr/FileHandler2.ashx?f=endokrin-sistem-fizyolojisi.pdf>, Erişim Tarihi: 18.08.2020.
- Anonim. 2020. Web Sitesi: <https://en.wikipedia.org/wiki/Levonorgestrel>, Erişim Tarihi: 17.08.2020.
- Anonim. 2021. Web Sitesi: <https://veteriner.erciyes.edu.tr/Uploads/files/Endokrin%20Sistem.pdf>, Erişim Tarihi: 12.01.2021.
- Anonim. 2023. Web Sitesi: https://tr.wikipedia.org/wiki/%C3%87evre_kirlili%C4%9Fi, Erişim Tarihi: 15.05.2023.
- Ahmad, I., Maria, V.L., Oliveira, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to-naphthoflavone. Mutat. Res., 608: 16–28. doi: 10.1016/j.mrgentox.2006.04.020.
- Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H.E., Yön, N.D., K, F.E. 2014. Balıklarda ağır metal ve pestisitler tarafından indüklenen oksidatif stres mekanizmaları. Ege J Fish Aqua Sci 31(3): 155 -160(2014).
- Akkuş, I., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksan, A. ve zdemir, A. 2016. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi 3(2):1-1.
- Aktaş, M., 2005. Değirmenci,U., Ercan, S.K., Tamer, L., Atık, U., Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 3, 95-99.
- Alak, G., Atamanalp, M., Uğar, A., Arslan, H., şensurat, T., Parlak, V., Kocaman, E.M., 2013. Investigation of humic acid effects versus cadmium toxicity on hematological parameters of Brown trout (*Salmo trutta fario*) (in Turkish with English abstract). Ege J Fish Aqua Sci, 29(4): 181-185. doi: 10.12714/egejfas.2013.29.4.06.
- APHA, 1995. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th. Edition, Washington, USA.
- Arrick, B. ve Nathan, C., 1984. Glutathione Metabolism as Determinant of The Therapeutic Efficacy: A Review. Cancer Res, 33, 4224-32.

- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E.Ş., Yılmaz, B. 2019. Oksidatif Stres Durumunda Antioksidan Enzimlerin Rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) Ve Glutasyon peroksidaz (Gpx). Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg, 2019;26(3):362-369 doi: 10.17343/sdutfd.566969.
- Basaga, H.S., 1990. Biochemical Aspects of Free Radicals, Biochem. Cell. Biol., 68, 989-998.
- Bayır, A. 2005. "Hınıs çayı (Murat havzası)'nda yaşayan siraz balığı (*Capoeta capoeta umbla*)'nın antioksidan enzim aktiviteleri, serum lipitleri, lipoproteinleri ve hematolojik parametrelerin mevsimsel değişimlerinin incelenmesi" Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, Erzurum.
- Bergman, A., Heindel, J.J., Kasten, T., Kidd, K.A., Jobling, S., Neira, M., Zoeller, R.T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Kortenkamp, A., Muir, D., Drisse, M.N.B., Ochieng, R., Skakkebaek, N.E., Bylehn, A.S., Iguchi, T., Toppari, J., Woodruff, T.J., 2013. The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. Environ. Health Perspect. 121, A104–A106.
- Besse, J. ve Garric, J. 2009. Progestagens for Human Use, Exposure and Hazard Assessment for the Aquatic Environment. Environmental Pollution, 157 (2009) 3485-3494.
- Beutler, E. 1984. Red cell metabolism, A Manual of Biochemical Methods Grune and Starton, New York, s:160.
- Brito, D.M., Porto, R.M., Vidal, M.T.C., Ojeda, R.S., Perez, A.R., 2010. Excretion Study of Clomiphene in Human Urine. Evaluation of Endogenous Steroids Profile after Multiple Oral Doses. J. Braz. Chem. Soc. 21 (12), 2220–2225.
- Brockmeier, E.K., Scott, P.D., Denslow, N.D., Leusch, F.D.L. 2016. Transcriptomic and physiological changes in Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to progestins and anti-progestagens. Aquat Toxicol 179:817. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.002>.
- Brown JS. 2009. Effects of bisphenol-A and other endocrine disruptors compared with abnormalities of schizophrenia: an endocrine-disruption theory of schizophrenia. Schizophrenia Bulletin. 2009;35:256–278.
- Bursch W, Lauer B, Timmermann-TROTiener I, Barthel G, Schuppler J, Schulte-Hermann R. 1984. Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. Carcinogenesis 1984;5(4):453-8.
- Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., L Freeman, J., 2016. Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. Curr. Genom. 17, 515–527. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160513105959>.

- Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Hutchinson, T.H., Lange R., Heijerick, D., Janssen, C., Anderson, P.D., and Sumpter, J.P. 2008. Derivation of an aquatic predicted no-effect concentration for the synthetic hormone, 17 alpha-ethinyl estradiol. *Environ. Sci. Technol.* 42, 7046-7054.
- Cano-Nicolau, J., Garoche, C., Hinfrey, N., Pellegrini, E., Boujrad, N., Pakdel, F., Kah, O., Brion, F., 2016. Several synthetic progestins disrupt the glial cell specific-brain aromatase expression in developing zebra fish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 305 (2016) 12–21.
- Cardoso, P.G., Rodrigues, D., Madureira, T.V., Oliveira, N., Rocha, M.J., Rocha, E. 2017. Warming modulates the effects of the endocrine disruptor progestin levonorgestrel on the zebrafish fitness, ovary maturation kinetics and reproduction success. *Environmental Pollution* 229 (2017) 300-311.
- Cardoso, P.G., Resende-de-Oliveira, R., Rocha, E. 2019. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and vitellogenin. *Environmental Pollution* 252 (2019) 1059-1067.
- Carnevali, O., Santangeli, S., Forner-Piquer, I., Basili, D., Maradonna, F., 2018. Endocrine- disrupting chemicals in aquatic environment: what are the risks for fish gametes? *Fish Physiol. Biochem.* <https://doi:10.1007/s10695-018-0507-z>.
- Chao, J.C., Huang, C.H., Wu, S.J., Yang, S.C., Chang, N.C., Shieh, M.J. ve Lo, P.N., 2002. Effects of beta-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperLipidemic smokers, *J Nutr Biochem.*, 13, 427-434.
- Chaudiere, J., Ferrari,-Iliou, R. 1999. Intracellular Antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949-962.
- Cheeseman, K, H. ve Slater, T,F., 1993. An Introduction to Free Radical Biochemistry, *Brit Med Bull.*, 49,3, 479-480.
- Chen S., Lin C., Tan, J., Wang, Y., A, Wang, X., Wang, X., Liu, L., Li, J., Hou, L., Liu, J., Leung, J.Y.S. 2021. Reproductive potential of mosquitofish is reduced by the masculinizing effect of a synthetic progesterone, gestodene: Evidence from morphology, courtship behaviour, ovary histology, sex hormones and gene expressions. *Science of the Total Environment* 769 (2021) 144570.
- Christen, V., Hickmann, S., Rechenberg, B., and Fent, K. 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquat. Toxicol.* 96, 167-181.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wlegand, C. 2011. Molecular Effects and Bioaccumulation of Levonorgestrel in the Non-target Organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*, 159 (2011) 38-44.
- Croxatto, H.B. 2002. Mechanisms that explain the contraceptive action of progestin implantsfor women. *Contraception* 65, 21-27.

- Czarny, K., Szczukocki, D., Krawczyk, B., Skrzypek, S., Zielinski M., Gadzała-Kopciuch, R. 2019. Toxic effects of single animal hormones and their mixtures on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus*. *Chemosphere*, 224 (2019) 93e102.
- Contardo-Jara, V., Lorenz, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Kloas, W., Wlegand, C. 2011. Molecular Effects and Bioaccumulation of Levonorgestrel in the Non-target Organism *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution*, 159 (2011) 38-44.
- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., Van Der Kraak, G.J. 2002. Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization, p.180.
- Darbre, P.D. 2015. Endocrine disruption and human health. New York: Elsevier/Academic Press.
- De Alda, M.J.L., Barcelò, D. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 892 (1–2) (2000) 391–406.
- DeCourten, M. Brander, S. M. 2017. Combined effects of increased temperature and endocrine disrupting pollutants on sex determination, survival, and development across generations. *Scientific RepoRts* | 7: 9310 | DOI:10.1038/s41598-017-09631-1
- De Zwart, L. L., Meerman, J., Commandeur, H. N., Vermeulen N.P.E. 1999. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free radical Biology & Medicine*. 26(1-2) 202-206.
- Demin, O.V., Kholodenko, B.N., Skulachev, V.P., 1998. A model of O₂.-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol. Cell. Biochem.*, 184: 21– 33. doi:10.1023/A:1006849920918
- Devay, S. D., 2008. Karbon Tetraklorür ile Deneysel Siroz Oluşturulan Ratlarda Serbest Radikal Metabolizması; Stobadin’ın Antioksidan Etkisi, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- DeQuattro, Z. A. Peissig, E.J., Antkiewicz, D.S., Lundgren, E.J., Hedman, C.J., Hemming, J. D.C., Barry, T.P. 2012. Effects of Progesterone on Reproduction and Embryonic Development in the Fathead Minnow (*Pimephales Promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 31, No. 4, pp. 851–856, 2012.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*. 2009;30(4):293–342.
- Dong Z., Xueyou Li,X., Chen Y., Zhang, N., Wang, Z., Liang Y., Yusong Guo, Y. 2023. Short-term exposure to norethisterone affected swimming behavior and

- antioxidant enzyme activity of medaka larvae, and led to masculinization in the adult population. *Chemosphere*. 310 (2023) 136844.
- Durand, M., Cravioto, M.C., Raymond, E.G., Durán-Sánchez, O. Cruz-Hinojosa, M.L., Castell-Rodríguez, A., Schiavon, R., Larrea, F. 2001. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception, *Contraception* 64 (2001) 227–234.
- Dröge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82: 47–95.
- Dzul-Caamal, R., Olivares-Rubio, H.F., Lopez-Tapia, P., Vega-Lopez, A., 2013. Pro-oxidant and antioxidant response elicited by CH₂Cl₂ and CHCl₃ in *Goodea gracilis* using non-invasive methods. *Comp. Biochem. Physiol. A.*, 165(4):515-27. doi:10.1016/j.cbpa.2013.03.005.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl H. ve Jügens, G., 1992. The role of Lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radic Biol Med*, 13, 341-90.
- Fantone, J.C. ve Ward, P.A., 1985. Polymorphonuclear Leukocyte Mediated and Tissue Injury, *Hum Pathol.*, 16, 973-978.
- Fent, K., 2015. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: concentrations, effects and risk assessment. *Environ. Int.* 84, 115e130.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signaling*, 11: 861–905. doi:10.1089/ars.2008.2177.
- Frankel, T.E., Meyer, M.T., Orlando, E.F. 2016. Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *General and Comparative Endocrinology*, 234 (2016) 161–169.
- Fridovich, I., 1983. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant, *Ann Rev. Pharmacol Toxicol*, 23, 239-257.
- Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessi-Fulgheri F. 2012. Endocrine disrupters: a review of some sources effects and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of Neuroendocrinology*. 2012;24:144–159.
- Gürdal, F., Ademoğlu, E., 2005. *Biyokimya. Nobel Kitap Evi*. 746-747.
- Harris, E.D., 1992. Regulation of antioxidant enzymes, *Faseb. J.*, 6, 2675-2683.
- He, P., Matich, E.K., Yonkos, L.T., Friedman, A.E., Ekin Atilla-Gokcumen, G., Aga, D.S., 2018. Mass spectrometry based detection of common vitellogenin peptides acROTs fish species for assessing exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Sci. Total Environ*. 646, 400-408.

- Hoffmann, F. ve Kloas, W. 2012. The Synthetic Progesteron, Levonorgestel, But Not Natural Progesterone, Affects Male Mate Calling Behavior of *Xenopus Laevis*. General and Comparative Endocrinology, 176 (2012) 385-390.
- Hook, S.E., Skillman, A.D., Small, J.A., Schultz, I.R., 2006. Gene expression patterns in rainbow trout. *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. Aquat. Toxicol., 77: 372–785. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.01.007.
- Horiguchi T. 2006. Masculinization of female gastropod mollusks induced by organotin compounds, focusing on mechanism of actions of tributyltin and triphenyltin for development of imposex. Environ Sci, 13:77–87.
- Hou, L. Chen, H., Tian, C., Shi, W., Liang, Y., Wu, R., Fang, X., Zhang, C., Liang, Y., Xie, L. 2018. The progestin norethindrone affects sex differentiation and alters transcriptional profiles of genes along the hypothalamic–pituitary–gonadal and hypothalamic–pituitary–adrenal axes in juvenile zebrafish *Danio rerio*. Aquatic Toxicology 201 (2018) 31–39.
- Hou, L., Chen, S., Liu, C., Guo, J., Chen, Z., Zhu, Q., Zhang, W., Xu, G., Liang, Y., Wu, R., Fang, X., Zhang, C., Xing, K. 2019. Transcriptomic and physiological changes in western mosquitofish (*Gambusia affinis*) after exposure to norgestrel. Ecotoxicology and Environmental Safety 171 (2019) 579–586.
- Hua, J., Han, J., Guo, Y., Zhou, B. 2015. The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. Aquat Toxicol 166:19. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.013>.
- Hua, J., Zhu, B., Guo, W., Wang, X., Guo, Y., Yang, L., Han, J., Zhou, B. 2022. Endocrine disrupting effects induced by levonorgestrel linked to altered DNA methylation in rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 257, 109332.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A. 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine, 2018;54: 287–293.
- İsbir, T. 1994. Antioksidan sistemler. Endotel. İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu. 92-98.
- Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, Lobenhofer EK. 2004. Shortchain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004;101:7199–7204.
- Jenkins, R. R. ve Tengji, J., 1981. Catalase Activity in Skeletal Muscle of Varying Fiber Types, Experimentia, 37, 67-68.
- Jerry, P., Liu, L., Zeng, M. ve Stamler, J.S., 2000. An apoptotic model for nitrosative stress, Biochem, 39, 1040-1047.

- Jialal, I. ve Grundy, S.M., 1993. Effect of combined supplementation with alphatocopherol, ascorbate, and beta carotene on low-density lipoprotein oxidation, *Circulation*, 88, 2780-2786.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G. 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.* 114, 32-39.
- Junior, E.A., Luciana Fernandes Duarte, L.F., Pirasol Vanunci, M.L., Teixeira, M.L., 2010. Bioequivalence of Two Oral Contraceptive Drugs Containing Ethinylestradiol and Gestodene in Healthy Female Volunteers. *J. Bioequival. Bioavail.* 2 (6), 125–130.
- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 3954–3962.
- Kaur, H., Kumar Bansal, G., Althobaiti, F., Aldhahrani, A., Usmani, S., Bala, M. 2021. Prevalence of reproductive drugs usage in humans and animals: A pilot study in Patiala city of India. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (2021) 3727–3734.
- Kazeto, Y., Place, A. R. & Trant, J. M. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology*, 69(1), 25-34. DOI: 10.1016/j.aquatox.2004.04.008.
- Keramati, V., Shahla, J., Ramin, M., 2010. Effect of diazinon on catalase antioxidant enzyme activity in liver tissue of *Rutilus rutilus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 5(5): 368-376.
- Kılbaş, S. 2006. L-Name hipertansif rantlarda lisinoprilin beyinde lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık Tezi.
- Kloas, W., Urbatzka, R., Opitz, R., Würtz, S., Behrends, T., Hermelink, B., et. Al. 2009. Endocrine disruption in aquatic vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1163, 187-200.
- Kolaylı, S. ve Keha E., 1999. A Comparative Study of Antioxidant Enzyme Activities in Freshwater and Seawater Adapted Rainbow Trout, *J Biochem Mol Toxicol.*, 13,6, 334-337.
- Kolayli, S., Küçük, M., Duran, C., Candan F. ve Dinçer, B., 2003. Chemical and Antioxidant Properties of *Laurocerasus officinalis* Roem. (Cherry Laurel) Fruit Grown in the Black Sea Region, *J Agr Food Chem.*, 51, 7489-7494.
- Kroupova, H. K., Trubiroha, A., Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Luts, I., Grabic, R., Kocour, M., Kloas, W. 2014. The Progestin Levonorgestrel Disrupts Gonadotropin Expression and Sex Steroid Levels in Pubertal Roach (*Rutilus rutilus*). *Aquatic Toxicology*, 154 (2014) 154-162.

- Kvarnryd, M., Grabic, R., Brandt, I., and Berg, C. 2011. Early life progestin exposure causes arrested oocyte development, oviductal agenesis and sterility in adult *Xenopus tropicalis* frogs. *Aquat. Toxicol.* 103, 18-24.
- Lai, K.M., Johnson, K.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3890–3894.
- Länge, R., Hutchinson, T.H., Croudace, C.P., Siegmund, F., Schweinfurth, H., Hampe, P., Panter, G.H., Sumpter, J.P., 2001. Effects of the synthetic estrogen 17aethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216–1227.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Grabic, R., Li, P., Machova, J., Velisek, J., et al., 2010. Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 98, 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.02.017>.
- Liang, Y.-Q., Huang, G.-Y., Ying, G.-G., Liu, S.-S., Jiang, Y.-X., Liu, S., Peng, F.-J., 2015. A time-course transcriptional kinetics of the hypothalamic-pituitary-gonadal and hypothalamic-pituitary-adrenal axes in zebrafish eleutheroembryos after exposure to norgestrel. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 112-119.
- Liang, Y., Huang, G., Lin, Z., Li, J., Yang, J., Zhong, L., Ying, G. 2018. Reproductive effects of synthetic progestin norgestrel in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 190 (2018) 17e24.
- Lorenz, C., Contardo-Jara, V., Trubiroha, A., Krüger, A., Viehmann, V., Wiegand, C., Pflugmacher, S., Nützmann, G., Lutz, I., Kloas, W., 2011. The synthetic gestagen levonorgestrel disrupts sexual development in *Xenopus laevis* by affecting gene expression of pituitary gonadotropins and gonadal steroidogenic enzymes. *Toxicol. Sci.* 124, 311–319.
- Lorenz, C., Opitz, R., Trubiroha, A., Lutz, I., Zikova, A., Kloas, W. 2016. The synthetic gestagen levonorgestrel directly affects gene-expression in thyroid and pituitary glands of *Xenopus laevis* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 177 (2016) 63–73.
- Lushchak, V.I., 2008. Oxidative stress as a component of transition metal toxicity in fish. In: *Aquatic Toxicology Research Focus*. ISBN: 978-1-60456-192-0.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13–30.
- Malhotra, J.D., Kaufman, R.J., 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: A vicious cycle or a double-edged sword. *Antioxid. Redox Signaling*, 9: 2277–2293. doi: 10.1089/ars.2007.1782.
- Mannai, A., Hmida, L., Bouraoui, Z., Guerbej, H., Gharred, T., Jebali, J. 2021. Does thermal stress modulate the biochemical and physiological responses of *Ruditapes*

decussatus exposed to the progestin levonorgestrel. Environ Sci Pollut Res. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21786-7>.

- Masaki, N., Yamada, S., Ogata, I., Ohta, Y. ve Fujiwara, K., 1988. Enhancement of carbon tetrachloride-induced liver injury by glucagon and insulin treatment, Res. Exp. Med., 188, 27-33.
- McCord, J.M. ve Fridovich, I., 1978. The biology and pathology of oxygen radicals, Annals of Internal Med., 89, 122- 128.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. ve Remacle, J., 1994. Importance of Superoxide dismutase, catalase, Cu-Zn superoxide dismutase for cell survival against oxidative stress, Free Radic. Biol. Med., 17, 235-248.
- Mişe Yonar, S., Yonar, M.E., Yöntürk, Y., 2014. The effect of Curcumin some antioxidant parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). (in Turkish with English abstract). Firat Univ. Journal of Science, 26(1): 53-57.
- Morales, E.A., Jimenez A., Hidalgo C.M., Abellan E., Cardenete G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. Comparative Biochemistry and Physiology. 139: 153-161.
- Narvaez, J.F., Grant, H., Gil, V.C., Porras, J., Sanchez, J.C.B., Duque, L.F.O., Sossa, R.R., Quintana-Castillo, J.C. 2019. Assessment of endocrine disruptor effects of levonorgestrel and its photoproducts: Environmental implications of released fractions after their photocatalytic removal. Journal of Hazardous Materials 371 (2019) 273–279.
- OECD, 1992. Organisation for Economic Cooperation and Development, Guideline for the Testing of Chemicals: Fish, Acute Toxicity Test, No:203.
- Ohkawa, H., Ohisini, N., Tagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Chemistry. 95: 351-358.
- Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., 2002. İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Orlando, E. F. ve Ellestad, L. E. 2014. Sources, Concentrations and Exposure Effects of Environmental Estrogens on Fish and Other Aquatic Wildlife, with an Emphasis on Reproduction. General and Comparative Endocrinology 203 (2014) 241-249.
- Papa, S., Skulachev, V.P., 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol. Cell. Biochem., 174: 305–319.
- Paulos, P., Runnalls, T. J., Nallani, G., Point, T., Scott, A. P., Sumpter, J. P., Huggett, D. B. 2010. Reproductive Responses in Fathead Minnow and Japanese Medaka Following Exposure to a Synthetic Progestin, Norethindrone. Aquatic Toxicology, 99 (2010) 256-262.

- Pawlowski, S., van Aerle, R., Tyler, C.R., Braunbeck, T. 2004. Effects of 17 α -ethinyestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 330-345.
- Pietsch, C., Neumann, N., Knopf, K., Wuert, Z.S., Kloas, W. 2009. Progestogens cause immunosuppression of stimulated carp (*Cyprinus carpio*) Leukocytes in vitro. *Comp Biochem Physiol C* 2009;150:16–24.
- Placer, Z.A., Cushman, L., Johnson, B.C., 1966. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biological fluids. *Anal Biochem.* 16: 359-364.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Biol Chem.* 1991;266:22028–22034.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152-159.. pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 913-920.
- Richardson, B.J., Lam, P.K.S., Martin, M. 2005. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China. *Marine Pollution Bulletin* 50 (2005) 913–920.
- Rocha, M. J. and Rocha, E. 2022. Synthetic Progestins in Waste and Surface Waters: Concentrations, Impacts and Ecological Risk. *Toxics*, 10(4), 163.
- Runnalls, T.J., Beresford, N., Losty, E., Scott, A.P., Sumpter, J.P. 2013. Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2077-2084.
- Santos, T.G., Martinez, C.B.R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89: 1118-1125. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.05.096.
- Sarkar, S., Sandip, M., Ansuman, C., 2014. Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107: 1-8. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.012.
- Sepici, D.A., Benli, A.C., Selvi, M., Sarıkaya, R., Şahin, D., Özkul, A., Erkoç, F., 2009. Sublethal cyfluthrin toxicity to Carp 66 (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings: Biochemical, hematological, histopathological alterations. *Exotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1433-1439.
- Shi, W., Hu, L., Huang, G., Liu, Y., Zhang, J., Xie, L., Ying, G. 2019. Dydrogesterone affects the transcription of genes in GnRH and steroidogenesis pathways and increases the frequency of atretic follicles in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 216 (2019) 725-732.

- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, P.A., Santos Teixeira, J.M., Lazarotto Mileski, K.M., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Honda Kowashita, N., Martins Baviera, A., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106:181-187.
- Sözmen, E.Y., 2002. Yaşlanma biyokimyası, In: Onat T, Emerk K, Sözmen EY, İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Stanczyk F.Z., Archer D.F., Bhavnani B.R. 2013. Ethinyl estradiol and 17b-estradiol in combined oral contraceptives: pharmacokinetics, pharmacodynamics and risk assessment. *Contraception*, 87:706–727.
- Steinbach, C., Císař, P., Šauer, P., Klicnarová, J., Schmidt – Posthaus, H., Golovko, O., Kroupová, H.K. 2019. Synthetic progestin etonogestrel negatively affects mating behavior and reproduction in Endler's guppies (*Poecilia wingei*). *Science of the Total Environment* 663 (2019) 206–215.
- Steinberg, F.M. ve Chait, A., 1998. Antioxidant vitamin supplementation and Lipid peroxidation in smokers, *Am J Clin Nutr.*, 68, 319-327.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C. 2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* 39,4321-4332.
- Svensson, J., Mustafa, A., Fick, J., Schmitz, M., Brunström, B. 2016. Developmental exposure to progestins causes male bias and precocious puberty in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 177 (2016) 316–323.
- Swedenborg E, Ruegg J, Mäkelä S, Pongratz I. 2009. Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *Journal Molecular Endocrinology*, 43:1–10.
- Torreilles, S.L., McClure, D.E., Green, S.L. 2009. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48 (5) (2009) 512–516.
- TSE, 1988. Türk Standartları Enstitüsü, Su Kirliliği Kontrolü – Zehirlilik Deneyleri – Kısım 1, TSE TS 5676, (1988).
- TSE, 1990. Türk Standartları Enstitüsü, Endüstriyel Sıvı Atıklar ve Atıksular – Akut Zehirlilik Deneyleri – Canlılık Deney Metodları, TSE TS 8264, (1990).
- Tuna-Keleştemur, G., Özdemir, Y. 2011. Balıklarda Antioksidan Savunma ve Oksidatif Stres. ISSN 1308-0040, E-ISSN 2146-0132.
- Tyler, C.R., Jobling, S. 2008. Roach, sex, and gender-bending chemicals: the feminization of wild fish in English rivers. *Bioscience* 58 (11), 1051-1059.

- Uchida, K., 2003. 4-Hydroxy-2-Nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progr. Lip. Res.*, 569, 1-26.
- Ulus, N.N., Sahilli, M., Avcı, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., Arı, N., Balı M., Stefek, M., Stolc, S., Gajdosik, A. ve Karasu, C., 2003. Pentose phosphate pathway, glutathionedependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, *Neurochem. Res*, Jun, 28, 815-823.
- Üreten, M., İşisağ Üçüncü, S., 2013. The effects of Dioktyl adipate (DOA) on liver and gill histology of *Sparus aurata* (Sea bream). (in Turkish with English abstract). *Ege J Fish Aqua Sci* 30(3): 115-122. doi: 10.12714/egejfas.2012.30.03.05.
- Wang, X., Tan, Z., Chen, S., Gui, L., Li, X., Ke, D., Hou, L., Leung, J.Y.S., 2021. Norethindrone causes cellular and hepatic injury in zebrafish by compromising the metabolic processes associated with antioxidant defence: insights from metabolomics. *Chemosphere* 275, 130049. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130049>.
- Wright, J., George, S., Martinez-Lara, E., Carpene, E., Kindt, M., 2000. Levels of cellular glutathione and metallothionein affect the toxicity of oxidative stressors in an established carp cell line. *Mar. Environ. Res.*, 50: 503–508.
- Yaprak, M. 1998. Akut Miyokart Enfarktüsünde Biyokimyasal Parametreler ve Antioksidan Sistemle İlişkisi. Uzmanlık Tezi Çukurova Üni. Tıp Fak. Biyokimya Anabilimdalı.
- Yager, D. 1992. A unique sound production system in the pipid anuran *Xenopus borealis*, *Zool. J. Linnean Soc.* 104 (1992) 351–375.
- Yıldız, O. 2011. Bir Gıda Maddesi Olarak Kestane Poleninin Kimyasal Bileşimi, Biyoaktif Özellikleri Ve Karaciğer Hasarını Önlemedeki Rolü. Doktora Tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Yıldız Fendoğlu, B., Koçer-Gümüşeli, B., Erkekoğlu, P. 2019. Endokrin Bozucu Kimyasal Maddelere ve Etki Mekanizmalarına Genel Bir Bakış. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Volume 39 / Number 1 / January 2019 / pp. 30-43.
- Yılmaz, M. 2010. Bazı pestisitlerin sıçan dokularındaki asetilkolinesteraz ve antioksidan enzim aktiviteleri ile malondialdehit düzeyine etkileri. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- You L, Sar M, Bartolucci E, Ploch S. 2001. Induction of hepatic aromatase by p,p'DDE in adult male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 178:207–214.
- Young, I.S. ve Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease, *J Clin Pathol*, 54, 176-186.

- Yurdakök Dikmen, B. 2017. Endokrin Bozucular, s. 235-241. Yurdakök Pediatri, Cilt 1, Bölüm 22, edit. Murat Yurdakök. Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Zeilinger, J., Steger-Hartmann, T., Maser, E., Goller, S., Vonk, R., Lange, R. 2009. Effects of Synthetic Gestagens on Fish reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2663-2670.
- Zhao, X., Wang, Q., Li, X., Xu, H., Ren, C., Yang, Y., Xu, S., Wei, G., Duan, Y., Tan, Z., Fang, Y. 2023. Norgestrel causes digestive gland injury in the clam *Macra veneriformis*: An integrated histological, transcriptomics, and metabolomics study. *Science of the Total Environment*. 871 (2023) 162110.
- Zheng, W., Yates, S.R., Bradford, S.A., 2008. Analysis of steroid hormones in a typical dairy waste disposal system. *Environ. Sci. Technol.* 42, 530–535.
- Zikova, A., Lorenz, C., Hoffmann, F., Kleiner, W., Lutz, I., Stöck, M., Kloas, W. 2017. Endocrine disruption by environmental gestagens in amphibians e A short review supported by new in vitro data using gonads of *Xenopus laevis*. *Chemosphere* 181 (2017) 74-82.
- Zrinyi, Z., Maasza, G., Zhangb, L., Vertesb, A., Lovasa, S., Kissc, T., Elekes, K., Pirgera, Z. 2017. Effect of progesterone and its synthetic analogs on reproduction and embryonic development of a freshwater invertebrate model. *Aquatic Toxicology* 190 (2017) 94–103.
- Zucchi, S., Castiglioni, S., Fent, K. 2012. Progestins and antiproggestins affect gene expression in early development in zebrafish (*Danio rerio*) at environmental concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 46 (9), 5183-5192.
- Zucchi, S., castiglioni, S., Fent, K. 2013. Progesterone alters global transcription profiles at environmental concentrations in brain and ovary of female zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 12548-12556.
- Zucchi, S., Mirbahai, L., Castiglioni, S., Fent, K. 2014. Transcriptional and physiological responses induced by binary mixtures of drospirenone and progesterone in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 48 (6), 3523-3531.

EKLER

EK – 1

MDA konsantrasyon grafiği (nmol/L)

