

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YEME FARKLI ORANLARDA İLAVE EDİLEN DEMİRİN
KABUK DEĞİŞTİRME DÖNEMİNDEKİ *Astacus
leptodactylus* (Esch., 1823)'UN MALONDİALDEHİT VE
BAZI ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Aslan TUNÇ

Yüksek Lisans Tezi
Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

OCAK-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEME FARKLI ORANLARDA İLAVE EDİLEN DEMİRİN KABUK
DEĞİŞTİRME DÖNEMİNDEKİ *Astacus leptodactylus* (Esch., 1823)'UN
MALONDİALDEHİT VE BAZI ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Aslan TUNÇ

Anabilim Dalı: Su Ürünleri Yetiştiriciliği

Danışman: Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

OCAK-2018

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEME FARKLI ORANLARDA İLAVE EDİLEN DEMİRİN KABUK
DEĞİŞTİRME DÖNEMİNDEKİ *Astacus leptodactylus* (Esch., 1823)'UN
MALONDİALDEHİT VE BAZI ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aslan TUNÇ

112128105

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 22 Aralık 2017

Tezin Savunulduğu Tarih : 11 Ocak 2018

Bu Tez 11/01/2018 tarihinde, aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği/oy çokluğu ile başarılı/başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ

Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Sibel KÖPRÜCÜ

Doç. Dr. Durali DANABAŞ

OCAK-2018

ÖNSÖZ

Tez sürecinde benden destek ve ilgisini esirgemeyen yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. Özden BARIM ÖZ'e,

Yüksek Lisans tezimi SÜF.14.02 nolu proje ile destekleyen FÜBAP birimine,

Yüksek lisansım boyunca sürekli bana destek olup yalnız olmadığımı hissettiren arkadaşım sayın Hülya ŞAHİN'e,

Ve bu hayattaki tek vazgeçilmezim olan hayatımın her anında yanımda olan her şeye rağmen arkamda durup bana sürekli destek olan eşim Şenay ve çocuklarıma;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Aslan TUNÇ
ELAZIĞ - 2018

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Astacus leptodactylus</i> İle İlgili Genel Bilgiler	5
1.1.1. Kültür Şartlarında Tatlısu İstakozlarının Besin İhtiyaçları	8
1.1.2. Tatlısu İstakozlarında Sindirim Enzimleri ve Salgıları	9
1.1.3. Hepatopankreas	10
1.1.4. Tatlısu İstakozlarında Büyüme ve Üreme	10
1.1.5. Tatlısu İstakozlarında Su Kalitesi.....	12
1.2. Demir (Fe)	12
1.2.1. Demir (Fe)'in Genel Tanımı ve Organizmadaki Dağılımı	12
1.2.2. Demirin Emilimi, Taşınması, Depolanması, Metabolizması ve Atımı	13
1.2.3. Demirin Metabolizması ve Dönüşümü.....	14
1.2.4. Demirin İşlevleri.....	15
1.2.4.1. İmmün Sistem.....	15
1.2.4.2. Kan Yapımı ve Elektron Transport Sistemi	15
1.2.4.3. Redoks işlevi	15
1.3. Su Canlılarında Demir İle İlgili Yapılan Çalışmalar	16
2. MATERYAL ve METOT	19
2.1. Materyal.....	19
2.1.1. Araştırma Yeri ve Alanı	19
2.1.2. Tatlısu İstakozu Materyali.....	19
2.1.3. Yem Materyali.....	19
2.1.4. Araştırmada Kullanılan Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	20
2.1.5. Diğer Araç ve Gereçler.....	21
2.2. Metot	21

2.2.1.	Araştırmanın Planlanması ve Kurulması.....	21
2.2.2.	Araştırma Rasyonlarının Hazırlanması	21
2.2.3.	Araştırma Rasyonlarının pH ve Suda Çözünürlük Sürelerinin Tespiti	22
2.2.4.	Araştırma Dönemleri.....	22
2.2.5.	MDA, SOD ve GSH Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	23
2.2.6.	GSH-Px Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	23
2.2.7.	Kullanılan Yöntemler	23
2.2.7.1.	Dokuda Malondialdehit (MDA)'in Belirlenmesi	23
2.2.7.2.	SOD Aktivitesinin Tayini.....	24
2.2.7.3.	Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini	26
2.2.7.4.	GSH Tayini.....	28
2.2.7.5.	Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini	29
3.	BULGULAR	31
4.	SONUÇLAR ve TARTIŞMA	35
	KAYNAKLAR	39
	ÖZGEÇMİŞ	48

ÖZET

Bu çalışma 01 Temmuz 2014 – 20 Ekim 2014 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada, erkek tatlısu istakozu (*Astacus leptodactylus*) rasyonuna farklı oranlarda demir (Fe) katılmasının; tatlısu istakozunun, hepatopankreas ve kasındaki lipid peroksidasyon (Malondialdehit (MDA)), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri üzerine etkisinin ortaya konması amaçlandı. Çalışma; tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adapte edildiği dönem (AD), vücutta gastrolitlerin oluştuğu dönem (GD), tatlısu istakozlarının kabuklarını bıraktıkları dönem (YD) ve kabuklarının serleştiği dönem (KD) olmak üzere dört farklı periyotta yapıldı. Bu amaçla, bir kontrol (K) ve dört adet deneme (F1, F2, F3, F4) rasyonu hazırlandı. Rasyon öğeleri kontrol rasyonuna $28,60 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ demir katkısı sağlamaktadır. Kontrol rasyonuna $21,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$, $71,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$, $171,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ ve $371,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ demir sülfat katılarak sırasıyla F1, F2, F3 ve F4 rasyonları oluşturuldu. Çalışma üç tekrar halinde gerçekleştirildi.

Sonuç olarak, kasa göre hepatopankreasda analiz edilen bütün parametreler daha yüksekti. Çalışmada AD ve KD dönemine göre GD ve YD döneminde dokulardaki MDA değeri daha yüksek, SOD ve GSH-Px değerleri daha düşüktü. Ancak, GSH değerinde dönemler arasında çok fazla değişim meydana gelmedi. Ayrıca çalışma sonucunda, *A. leptodactylus* türü tatlısu istakozlarının yetiştiriciliğinde kabuk değiştirme döneminde tatlısu istakozlarının yemine $171,40\text{-}371,40 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) katılmasının canlının bu dönemde oluşan stres ile mücadele etmesinde etkili olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Tatlısu istakozu, *Astacus leptodactylus*, Demir, MDA, Antioksidan.

SUMMARY

The Effects on Malondialdehyde and Some Antioxidants of *Astacus leptodactylus* (Esch. 1823) in Moulting Period of Different Levels of Iron Added to the Ration

This study was carried out between 01 July 2014 and 20 October 2014. In the present study, it was investigated the effects on lipid peroxidation (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and reduced glutathione (GSH) levels in hepatopancreas and muscle of male freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) of different levels of iron (Fe) added to the ration. The study was carried out at four different periods as the period when the crayfish was adapted to ambient conditions (AD), the period when the body formation gastrolith (GD), the period when crayfish left their shells (YD) and the period when the shells of the crayfish hardened the period they are left crayfish shells (SD) and the shell-curing periods (KD), for was four different periods. For this aim, a control (K) and four treatment (F1, F2, F3, F4) rations were prepared. The control ration constituted $28,60 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ iron. $21,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$, $71,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$, $171,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ ve $371,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ iron sülphate were added to the control ration in order to prepare the treatment rations F1, F2, F3, F4 respectively. The study was carried out with 3 replicates for each dietary treatment.

In conclusion, the all parameters analysed were higher in hepatopancreas than muscle. In this study, the level of MDA in tissues was higher in GD and YD periods according to AD and KD periods, but it was lower the levels of SOD and GSH-Px. However, there was not much change between the periods in GSH level. In addition, it was determined that the addition of $171,40\text{-}371,40 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) to the diet of crayfish during the moulting period in culture breeding of *A. leptodactylus* species crayfish was effective in combating the stress generated in this period.

Key Words: Crayfish, *Astacus leptodactylus*, Iron, MDA, Antioxidant.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.1. <i>Astacus leptodactylus</i>	5
Şekil 1.2. <i>Astacus leptodactylus</i> 'un Anatomisi.....	6
Şekil 1.3. <i>Astacus leptodactylus</i> beslenmesi.....	7
Şekil 1.4. <i>Astacus leptodactylus</i> 'un kabuk değişimi.....	11
Şekil 1.5. Demirin emilimi, taşınması, depolanması ve atımı	14



TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Çevresel Koşullar ve Su Kalitesi İstekleri	12
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan rasyonların yapısına giren yem maddelerinin bileşimi (%)	20
Tablo 2.2. Araştırma suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri	20
Tablo 2.3. Dokulardakilipidperoksidasyon ölçümü için kullanılan kimyasal maddelerin .	23
Tablo 2.4. Süperoksit dismutaz aktivite ölçümü.....	25
Tablo 2.5. GSH-Px aktivitesinin ölçümü.....	26
Tablo 2.6. GSH ölçümü	28
Tablo 2.7. Protein ölçümü.....	30
Tablo 3.1. <i>A. leptodactylus</i> 'ların ağırlık ve toplam uzunlukları	31
Tablo 3.2. Araştırma süresince teknelerdeki suyun ortalama sıcaklık (°C), Oksijen (mg L ⁻¹) ve pH değerleri	31
Tablo 3.3. Tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adapte edildiği dönem (AD), vücutta gastrolitlerin oluştuğu dönem (GD), tatlısu istakozlarının kabuklarını bıraktıkları dönem (YD) ve kabuklarının sertleştiği dönem (KD)'de Kontrol (K), Deneme 1 (F1), Deneme 2 (F2), Deneme 3 (F3) ve Deneme 4 (F4) gruplarındaki tatlısu istakozlarının hepatopankreasındaki ortalama lipid peroksidasyon (Malondialdehit (MDA)(nmol g ⁻¹ doku)), süperoksit dismutaz (SOD) (U mL ⁻¹), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (U mL ⁻¹) ve redükte glutatyon (GSH) (μmol mL ⁻¹) düzeyleri.....	32
Tablo 3.4. Tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adapte edildiği dönem (AD), vücutta gastrolitlerin oluştuğu dönem (GD), tatlısu istakozlarının kabuklarını bıraktıkları dönem (YD) ve kabuklarının sertleştiği dönem (KD)'de Kontrol (K), Deneme 1 (F1), Deneme 2 (F2), Deneme 3 (F3) ve Deneme 4 (F4) gruplarındaki tatlısu istakozlarının kasındaki ortalama lipid (Malondialdehit (MDA)(nmol g ⁻¹ doku)), süperoksit dismutaz (SOD)(U mL ⁻¹), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (U mL ⁻¹) ve redükte glutatyon (GSH)(μmol mL ⁻¹) düzeyleri	33

KISALTMALAR LİSTESİ

F1	: Bir nolu deneme rasyonu
F2	: İki nolu deneme rasyonu
F3	: Üç nolu deneme rasyonu
F4	: Dört nolu deneme rasyonu
GSH	: Redükte glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
K	: Kontrol rasyonu
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO	: Lipid peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
O₂^{*-}	: Süperoksit radikali
OH^{*-}	: Hidroksil radikali
OSR	: Oksijen serbest radikali
R[*]	: Karbon merkezli radikal
RO[*]	: Alkoksil radikali
ROO[*]	: Peroksil radikali
ROOH	: Hidroperoksil radikali
SOD	: Süperoksit dismutaz
VHDL	: Çok yüksek yoğunluklu lipoprotein
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YO	: Yaşama oranı

1. GİRİŞ

Yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra insanoğlu doğada oluşturduğu kirliliği fark etmeye başlamıştır. Bu tarihten sonra hızla artan dünya nüfusu, belirli süreçlerde ortaya çıkan evsel ve endüstriyel atıklar yaşadığımız çevrenin hızla kirlenmesine neden olmuştur. Çağımızda meydana gelen bu denli komplike kirlilik gıda kaynaklarının korunması ve geliştirilmesi konusunu gündeme getirmektedir. Çünkü, dünya nüfusu zamanla artmakta; 2000 yılında 6,1 milyar olan nüfus 2015 yılında 7,2 milyar olmuş ve 2030 yılında ise 8,2 milyara ulaşması beklenmektedir. Buna karşın gıda kaynaklarında azalmalar olduğu bilinmektedir. Araştırmalar, gıda üretiminin dünyada yılda %1,2 oranında artacağını, talebin ise %1,3 oranında artarak gıda açığının yaşanacağı göstermektedir (URL 1). Bu ihtiyacı karşılamak amacıyla özellikle tarım ve hayvancılıkta kullanılan hormonlar ve kimyasal maddeler ürün miktarını arttırırken besin kalitesini düşürmekte, insan sağlığını tehdit edecek boyuta dahi ulaşabilmektedir. Bunun sonucunda da insanlar sularda doğal olarak yetişen, üreyip çoğalabilen su canlılarının tüketimine yönelmektedir. Besin maddeleri açlığa doğru giden dünyamız için bu kadar önemli, sağlıklı yaşam için ise bu kadar gerekli olmasına rağmen kentsel/endüstriyel atıklar sonucu oluşan kirlilik, su kaynaklarının fiziksel ve kimyasal yapısının bozulmasına, kirli sularda bulunan organik, inorganik, radyoaktif ve biyolojik kirleticilerin etkileriyle su canlılarının yaşam ve besin kalitesinin düşmesine sebep olmaktadır (Oost vd., 2003; Canpolat, 2007; Barım vd., 2009; Barım ve Karatepe, 2010).

Tatlısu istakozları dünya üzerinde geniş bir dağılım alanına sahiptir. Bu canlının yaklaşık 600 türü bulunmasına rağmen yurdumuzda *Astacus leptodactylus* doğal olarak bulunan türlerden biridir (Köksal, 1988). Dünyanın birçok bölgesinde lüks bir gıda maddesi olarak tüketilen bu tatlısu istakozu türü ülkemizde çok fazla tercih edilmemektedir. Bu nedenle büyük oranda Avrupa'ya ihraç edilmektedir. Ülkemiz ihracatı için önemli bir yere sahip olan bu türün miktarı, 1985-1986 yıllarında sularımızda görülen tatlısu istakozu vebasından ve balıkçıların aşırı ve bilinçsiz avcılık yapmasından dolayı oldukça azalmıştır (Köksal, 1988; Harlıoğlu, 2004). Bunun yanı sıra, sularımızın evsel ve endüstriyel atıklarla kirlenmesi, tatlısu istakozlarının et kalitesinin düşmesine de yol açmıştır. Bu nedenlerle; devlet kontrolünde önlemlerin alınması, bilimsel olarak araştırmaların yapılması gerekmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz sularında da

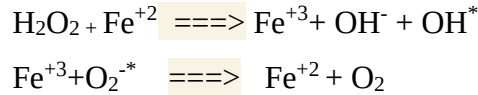
görülen evsel ve endüstriyel atıklar bu sulara yaşayan canlıların yaşam ortamlarını bozmaktadır. Buna paralel olarak et kalitelerinde de düşmeler meydana gelmektedir (Barım vd., 2009; Barım ve Karatepe, 2010; Aksu vd., 2014).

Dünyadaki atıkların suya karışmasıyla meydana gelen kirlilik özellikle Fe, Cu, As, Zn gibi metallerin oranındaki artışla kendini göstermekte ve tabii olarak su canlılarının biyolojik dengesinin bozulmasına sebep olmaktadır. Çünkü tüm canlılarda olduğu gibi suda yaşayan canlılarda da vücut içerisinde 'homeostasis' olarak ifade edilen bir vücut dengesi vardır. Canlı yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmek için dışarıdan besin alır ve bu besinler vücut içerisinde sindirim, absorpsiyon, dolaşım, solunum, metabolizma ve boşaltım mekanizmalarında değerlendirilir. Bu esnada özellikle elektron transportu olmak üzere çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda karbon (C), oksijen (O) ve sülfür (S) atomlarının ağırlıklı olarak meydana getirdiği serbest radikaller oluşur. Bu radikaller antioksidan olarak ifade edilen savunma mekanizmasının oranını aşacak oranda olduğu zaman süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimatik antioksidanlar, vitamin A, E, C, β -karoten gibi antioksidan maddeler devreye girerek serbest radikallerin oluşturacağı zararları önlemeye çalışır. Bu antioksidanlar da vücut dengesini bozan radikalleri ortamdan temizleyemezse hücre membranındaki protein, kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları radikallerle kolayca tepkimeye girerek oksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediklerinden, oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür ve oldukça zararlıdır (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995; Oost vd, 2003; Gözükara, 2011; Lushchak, 2012).

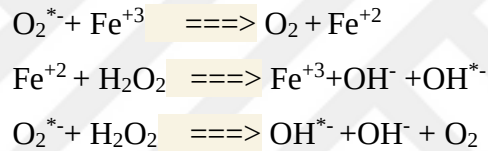
Vücut içerisinde radikal oluşumu genel olarak metabolik reaksiyonlar sırasında oksijenin tek elektronlu indirgenmesidir. Orbitalerin tek elektron alması ile süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), iki elektron alması ile peroksit anyonu (O_2^{2-}) meydana gelir. Peroksit anyonu ortamda iki proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilir veya süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron taşıyıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

İki süperoksit radikali birbirleriyle etkileşerek, biri oksitlenirken diğeri redüklenir. Böylece H_2O_2 ve O_2 meydana gelir (Gözükara, 2011). Dismutasyon tepkimesi olarak ifade edilen $O_2^{\cdot-}$ 'nin ortamdan temizlendiği bu reaksiyon ya kendiliğinden ya da enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir. Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'nin asıl üretimi süperoksidin ortamdan temizlenmesi ile olur (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

Hidrojen peroksit, ortaklanmamış elektrona sahip olmadığından dolayı, serbest radikal tanımına uymaz, fakat reaktif oksijen türleri sınıfına dahildir ve hidroksil radikalının öncüsüdür. Ayrıca demir proteinlerdeki demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif demir formlarını oluşturur. Bu formdaki demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olduğundan hücre membranlarında bulunan lipid peroksidasyon gibi radikal etkinlikli tepkimeleri başlatabilir.



Bu tepkime katalizörlü gerçekleşebildiği gibi katalizörsüz de gerçekleşebilir. Katalizörsüz tepkime çok yavaş ilerlerken, demirle katalizlenen tepkime oldukça hızlıdır.

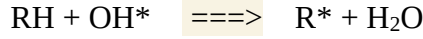


Metal katalizörlerin bulunmadığı durumlarda, süperoksit ve hidrojen peroksit kolayca ortamdan uzaklaştırılarak zararsız hale getirilebilir. Bu görevi katalaz ve peroksidaz gibi hücrelerde önemli antioksidan olan enzimler yerine getirir (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995).

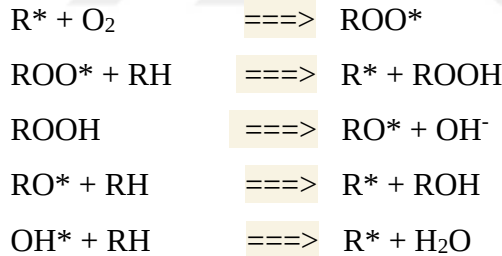
Vücut içerisinde oluşan radikallere karşı antioksidanlar yetersiz kalırsa, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve yararlı enzimleri bozularak zararlı etkiler meydana gelir (Kılınç, 1985; Akkuş, 1995). Mitokondrideki aerobik solunum ve kapiller permabilite bozulur (Kılınç, 1985; Winston ve Giulio, 1991; Akkuş, 1995; Gözükara, 2011).

Biyomoleküllerin büyük bir çoğunluğu serbest radikaller tarafından etkilenirler. Ancak lipidler en hassas sınıfı oluşturur. Membrandaki doymamış bağlar, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek malondialdehit gibi peroksidasyon ürünleri oluştururlar. PUFA'nın oksidatif yıkımı olarak da ifade edilen lipid peroksidasyon kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlediğinden meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (Bjørneboe vd., 1990; Murray vd., 1993; Akkuş, 1995; Wang ve Quinn, 1999).

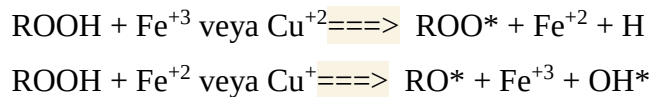
Çeşitli reaksiyonlar sonucunda oluşan radikal, lipid moleküllerinden bir H atomu çıkartarak karbon merkezli lipid radikalının (R*) oluşmasına yol açmaktadır (Kılınç, 1985; Gökalp vd., 1992; Macpherson, 1994; Akkuş, 1995; Kinter, 1995).



Bu aşamada H atomunun koparılmasıyla oluşan serbest yağ asiti radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksit radikali (ROO*) oluşturmaktadır. Oluşan ROO* yüksek reaksiyon yeteneğine sahip olup, başka bir yağ asidi molekülü ile yeni bir lipid hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir R* oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan bu R* yeniden oksijen ile birleşir ve RH (doymamış yağ asiti)'dan yeniden bir H⁺ ayrılmasını sağlar. Birçok olayda bu şekilde oluşan ROOH, RO* ve OH* verecek şekilde parçalanır ve bu oluşan radikaller hemen substrat ile reaksiyona girerek yeni zincir reaksiyonlarını başlatacak olan R* radikallerini oluştururlar. Böylece oluşan bir radikal sürekli olarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur (Kılınç, 1985; Murray vd., 1993; Macpherson, 1994; Kinter, 1995; Wang ve Quinn, 1999; Bell vd., 2002).



Hidroperoksitler ve bunlara bağlı olarak oluşan serbest radikaller (ROO*, RO* ve R*) ya birbirleri ile reaksiyona girerler ve zincir uzaması durur (Björneboe vd., 1990; Murray vd., 1993; Wang ve Quinn, 1999) ya da zincir uzamasının durması antioksidanlar tarafından gerçekleştirilir (Murray vd., 1993; Macpherson, 1994). Düzeyi artmış olan ROOH, olayın etkisi ile serbestleşmiş olan Fe⁺³, Cu⁺², Fe⁺² veya Cu⁺ ile de reaksiyona girer ve daha güçlü radikallere dönüşür (ROO* ve RO*).



Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA), membran bileşenlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olduğundan deformasyon, iyon taşınımı, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin toplanması gibi membran özelliklerini değiştirir (Murray vd., 1993; Bell vd., 2002).

Yapılan literatür taramaları sonucunda demirin etkinliği ile ilgili araştırmaların önemi ve özellikle kabuklu su canlılarındaki araştırmaların eksikliği dikkati çekmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında *A. leptodactylus* türü tatlısu istakozlarının yemine ilave edilen demir ile yapılan besleme sonucunda kabuk ve hepatopankreasta oksidatif stresin göstergesi ve lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) ile bu mekanizmada etkili olan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve redükte glutatyon (GSH) düzeyleri tespit edildi.

1.1. *Astacus leptodactylus* İle İlgili Genel Bilgiler

Astacus leptodactylus (Şekil 1.1) orijinal olarak Türkiye, Ukrayna, Güneybatı Rusya, İran, Kazakistan, Belarus, Slovakya, Bulgaristan, Romanya ve Macaristan'a kadar geniş bir alanda dağılım göstermektedir. Bu tür günümüzde 27 ülkede bulunmakla birlikte ayrıca 14 ülkeye de (Çek Cumhuriyeti, Polonya, Almanya, Finlandiya, Danimarka, Hollanda, İngiltere, Litvanya, Letonya, Fransa, İsviçre, Avusturya, İspanya ve İtalya) aşılanmıştır (Skurdal ve Taugbøl, 2002).

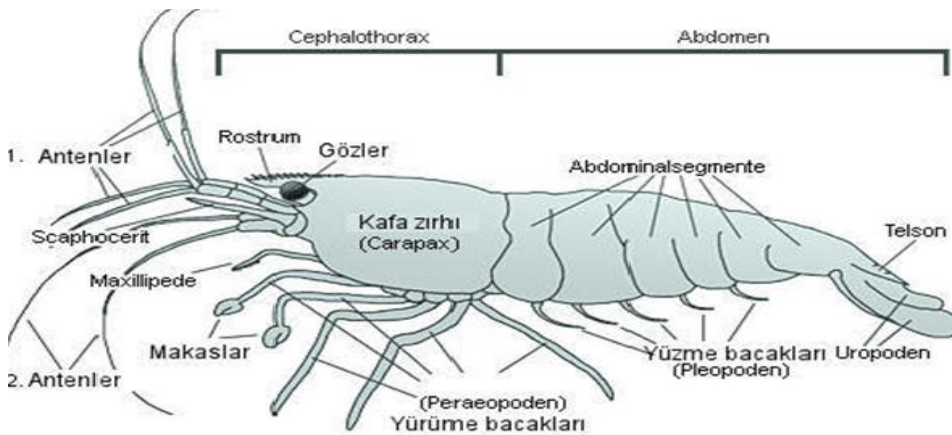


Şekil 1.1. *Astacus leptodactylus* (URL 1)

Tatlısu İstakozlarının Sistematikteki Yeri

Regnum	: Animalia	: Hayvanlar
Phylum	: Arthropoda	: Eklem bacaklılar
Classis	: Crustacea	: Kabuklular
Subclasis	: Malacostraca	: Gelişmiş kabuklular
Ordo	: Decapoda	: Ön ayaklılar
Familiya	: Astacidae	: İstakozlar
Genus	: <i>Astacus</i>	: İstakoz

Tatlısu istakozlarında vücut, sefalotoraks ve abdomen olmak üzere iki kısımdan oluşur. Bu bölümler toplam olarak 19 segmentten oluşmaktadır. Baş ve toraksı kapsayan bölüm olan sefalotoraks sert ve bölümlenmemiş bir kabuk olup karapaksı oluşturur. Baş kısmında; gözler, 2 çift anten, 1 çift mandibular uzantı, 2 çift maksil ve 3 çift de maksilliped bulunur. Gözler arasından ileri doğru uzayan çıkıntıya rostrum adı verilir. Toraks kısmında 5 çift yürüme ayakları (periopod) bulunmaktadır. Bunların ilk iki çifti keskin ve geniş olup kısaç olarak bilinir. Abdomen kısmı 5 çift yüzme ayakları (pleopod) ve kuyruktan (telson) oluşmuş ve net bir şekilde bölümlenmiştir. Kuyruk kısmı, telson ve üropod bölümlerinden oluşmaktadır (Şekil 1.2). Pleopodlar tatlısu istakozu türlerinin teşhisinde, cinsiyet ve cinsi olgunluğun tespitinde kullanılarak dişi erkek ayrımı yapılmaktadır. Gonopod olarak adlandırılan ilk iki pleopod çifti erkek bireylerde spermin transferini sağlayacak biçimde özelleşmiş ve uzun bir yapıya sahiptir. Dişilerde pleopodlar üreme aktivitesi dahil, tüm koşullarda aynıdır ve yumurtaları ve larvaları taşıyacak biçimde adapte olmuştur (Mazlum ve Yılmaz, 2012).



Şekil 1.2. *Astacus leptodactylus*'un Anatomisi (URL 2)

Tatlısu istakozları göllerde, çaylarda, nehirlerde ve hatta bataklıklarda yaşarlar. Genel olarak yassı taşların altında, çakıllı diplerde veya sığ çukurların içinde barınırlar. Bol bitkili, taşlıklı, çok derin olmayan kıyıları, oyuk ve balçıklı suları severler. Tatlısu istakozları, Türkiye akarsularında çeşitli bölgelerdeki göl ve göletler ile göller bölgesinde geniş bir alana yayılmıştır. Bol besin ve tatlısu istakozu için yeterli su kalitesine sahip iç sularımızda hızlı çoğalma olanağına sahip olan *A. leptodactylus*, *Astacus astacus* türüyle benzerlikler göstermektedir. Bu özelliğinden dolayı Türkiye başta, Batı Almanya olmak üzere 1980'li yıllarda Avrupa ülkelerine birinci sırada tatlısu istakozu ihraç eden ülke haline gelmiştir. Fakat bilinçsiz yaklaşımlar sonucunda bu önemli potansiyel yok olma tehlikesi ile karşı karşıyadır (Alpbaz, 2005).

Çok yönlü bir beslenme özelliğine sahip olan tatlısu istakozları hayvansal kaynaklı (kurtlar, böcekler, molluskalar, zooplankton vb.) ve bitkisel kaynaklı besinleri değerlendirebildikleri gibi, mikrobiyal açıdan zengin olan detritus ile de beslenme özelliğine sahiptir. Erişkin dönemlerinde özellikle yeşil bitkilerle beslenen tatlısu istakozlarının asıl besin olarak yararlandıkları kaynaklar dekompoze olmuş bitki saplarının üzerinde bulunan bakteri, mantar ve diğer mikroorganizmalardır (Şekil 1.3). Yapılan araştırmalarda tatlısu istakozu yavrularının, özellikle su bitkileri arasında yaşayan krustaselerle beslendiği, yetişkinlerin ise besin kaynaklarının %70'inin bitkisel orijinli olduğu belirlenmiştir (URL 3).



Şekil 1.3. *Astacus leptodactylus* beslenmesi (URL 2)

Tatlısu istakozları ilkbahar başlangıcından sonbahara kadar çok iyi beslenirler. Yoğun besin aldıkları zaman ise su sıcaklığının 20-25°C olduğu dönemlerdir. Kabuk değiştirme döneminde istakozlar bir müddet için besin almayı durdururlar (URL 2).

1.1.1. Kültür Şartlarında Tatlısu İstakozlarının Besin İhtiyaçları

Kültür şartlarında yapılan tatlısu istakozu yetiştiriciliğinde temel yemlerinin hazırlanmasında bitkisel ve hayvansal kökenli yem maddeleri kullanılır. Bunlar içerisinde en yaygın olanları balık unu, soya unu, kazein ve karides unudur (Huner vd., 1975; D'Abramo vd., 1985; Cuzon vd., 1994; Chen, 1998). Bu maddeler içerisinde en pahalı olan proteindir. Bütün canlılarda olduğu gibi tatlısu istakozlarının maksimum büyümesi için optimum protein seviyesinin tespit edilmesi çok önemlidir. Bu nedenle krustaselerin esansiyel aminoasit ihtiyaçlarının belirlenmesi oldukça önemlidir (Conklin, 1995a). Krustaselerin protein ihtiyacı türe, yaşam dönemine, fizyolojik duruma ve çevresel faktörlere göre değişmekle beraber %25-60 arasında değişmektedir (D'abramo ve Conklin, 1995; Chen, 1998).

Protein içeriği %31,7-50,5 arasında değişen yemlerle yapılan besleme sonucunda *Procambarus acutus* türü tatlısu istakozlarında en iyi sonuçlar %50,5 protein içeren yemlerde elde edilmiştir. *Pacifastacus leniusculus* türü tatlısu istakozlarının beslenmesinde kullanılan yemin içerisinde %40'ı hayvansal kaynaklardan sağlanan %39 protein içeriğinin yeterli olduğu görülmüştür. *Astacus astacus*'larda protein oranları %30 ve %40 olan yemlerle yapılan beslemeler sonucunda; en iyi gelişme %40 protein içeren yemlerde belirlenmiştir (D'Abramo vd., 1985; Goddard, 1988). Krustaselerin yavru dönemlerinde yemlerdeki protein miktarlarının araştırıldığı çalışmalarda; *Penaeus monodon*'larda %40, *P. merguensis*'lerde %50, *P. japonicus*'larda ise %60 olarak tespit edilirken *P. monodon* türü yumurtalı karideslerde bu değer %40 olarak belirlenmiştir (Cuzon vd., 1994; Chen, 1998).

Tatlısu istakozları yemlerdeki yağın yüksek seviyesine tolere edemediklerinden, yetersiz veya fazla miktardaki yağın bu tür canlılarda azalan büyüme ve yüksek ölüm oranına sebep olduğu belirlenmiştir (D'Abramo ve Robinson, 1989; Lee and Lawrence, 1997; Chen, 1998; Jover vd., 1999). Büyümelerinin gerçekleştiği kabuk değiştirme döneminde yağ asitlerinin seviyesi değişip yağ miktarı azaldığından, kabuk değiştirme esnasında ölüm oranında artmaya neden olur (New, 1976).

Çalışmalarda; yemlerdeki %10 yağ seviyesinin *Penaeus setiferus*'un yaşaması ve büyümesini olumsuz etkilediği saptanırken, *Palaemon serratus*'larda yemlerdeki %7,5'den %15'e kadar değişen yağ seviyesinin büyümeyi önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Karideslerin (penaid) beslenmesinde kullanılan yemlerdeki yağ miktarı %6-7,5, en fazla %10 olarak belirlenmiştir (Lee and Lawrence, 1997; Shiau, 1998). *Procambarus acutus* türü tatlısu istakozlarında ise yemlerdeki yağ seviyesi %0'dan %15'e kadar arttırıldığında %3 yağ içeren yemin büyümede artış sağladığı, %12 ve %15 yağ içeren yemlerin ise büyümeyi önemli derecede azalttığı saptanmıştır (D'Abramo ve Robinson, 1989). Yemlerdeki yağ miktarı vücuttaki antioksidan enzim sistemi üzerinde önemli etkiye sahip olduğundan özellikle dikkat edilmesi gerekir.

1.1.2. Tatlısu İstakozlarında Sindirim Enzimleri ve Salgıları

Tatlısu istakozlarında ana sindirim bezleri hepatopankreastır. Ayrıca alınan besinlerin sindirilmesi için gerekli enzimler mide ve barsak tarafından da salgılanır (Cuzon vd., 1994; Conklin, 1995b; Chen, 1998).

Tatlısu istakozlarının beslenmesi esnasında alınan proteinler mide bezleri ve hepatopankreas tarafından salgılanan seyreltik hidroklorik asit ve pepsinojen ile polipeptidlere parçalar. Karboksipeptidaz ve aminopeptidaz bu polipeptidleri amino asitlere dönüştürülür. Amino asitler vücutta dolaşarak hücrelerin yapıtaşlarını oluştururlar. Bunlar büyümede ve ölen hücrelerin yenilenmesinde görev alırlar. Meydana gelen şeker gerektiğinde kullanılmak üzere hepatopankreasda glikojen şeklinde depo edilir (Vonk, 1960; Goddard, 1988; Chen, 1998).

Yağların sindirimi için gerekli olan lipaz enzimi barsak ve hepatopankreas tarafından salgılanır. Yağlar lipaz etkisi ile gliserin ve yağ asitlerine ayrılmaktadır (Vonk, 1960). Bunların emiliminin büyük bir kısmı barsakta gerçekleşir (Cuzon vd., 1994). Yağ asitleri yağ dokusu ve hepatopankreasta depo edilir. Yağ dokusu iç organlarda bazende kaslarda bulunur. Fazla yağ asitleri yine şeker şekline dönüştürülerek hücrelerin solunumu sırasında enerji kaynağı olarak kullanılır (Vonk, 1960). Tatlısu istakozu ve diğer krustaselerde ana lipid deposu hepatopankreastır ve burada %92'ye kadar olan lipid seviyeleri ölçülmüştür (Suprunovic vd., 1983).

Karbonhidratların sindirimi amilaz enzimleri ile sağlanır. Bu enzimler hepatopankreas ve barsak tarafından salgılanır. Tatlısu istakozu tarafından fazla miktarda

alınan karbonhidrat glikojene dönüştürülerek hepatopankreasta depolanır ve gerektiğinde şekere dönüştürülerek solunum için gerekli enerji kaynağı olarak kullanılır (Vonk, 1960; Holdich ve Reeve, 1988).

1.1.3. Hepatopankreas

Tatlısu istakozlarında sefalotoraksda yer alan hepatopankreas, karapaksın ön kısmına doğru çıkıntı oluşturan iki lob vdaya doğru uzanan üçüncü bir lobun birleşmesinden oluşur. Proteinaz ve lipaz gibi sindirim enzimlerinin üretildiği, çeşitli sentezlerin yapıldığı ve fazla miktarda alınan besinlerin, bazı ağır metal ve kalsiyumun depolandığı yerdir. Hepatopankreas çok yönlü bir organdır ve tatlısu istakozlarının karaciğeri olarak isimlendirilir (Holdich ve Reeve, 1988; Conklin, 1995b; Chen, 1998; Vogt, 2002).

Yapılan birçok çalışmada hepatopankreas krustaselerin bulundukları fizyolojik şartların belirlenmesinde anahtar organ olarak kullanılmıştır. Özellikle hepatosomatik indeks (HSİ), hepatopankreasdaki nem ve enerji içeriği bu canlıların yaşadığı ortamdaki populasyon yoğunluğunun, yem kaynaklarının ve su kalitesinin göstergesidir. Bu indeks değeri canlının beslenme, kabuk değiştirme ve üreme dönemlerine bağlı olarak değişir (Jussila, 1997a; Barım, 2005). Dişi tatlısu istakozları yumurta taşıdıkları dönemde cinsel olgunluğa erişmeyen tatlısu istakozlarına oranla daha düşük hepatosomatik indekse sahiptir. Bunun sebebi ise hepatopankreasın enerji rezervlerini tüketmeleridir (Jussila, 1997b; Guoda, 1999). Hepatopankreasdaki enerji içeriği ve nem ters orantılıdır. Genel olarak bu organdaki nem içeriğinin düşük olması ortamdaki besin bolluğu ve besin rekabetinin az olduğunun işaretidir (Jussila, 1997a,b; Barım, 2005).

1.1.4. Tatlısu İstakozlarında Büyüme ve Üreme

Tatlısu istakozlarının büyüme ve gelişmeleri yaşadıkları suların yapısına, besin kaynağına ve iklim koşullarına bağlı olarak değişir (URL 3). Balıklardan farklı olarak tatlısu istakozlarının boyca büyümeleri kabuk değiştirme ile gerçekleşir. Bu dönemde tatlısu istakozları gayet sessiz ve sakin döneme girerek yem almazlar ve renklerinde değişimler olur (Atay, 1997). Genellikle ilk yılda 8 defa kabuk değiştirip 5 cm uzunluğa, ikinci yılda 5 defa kabuk değiştirip 8 cm uzunluğa erişirler. Üçüncü yılda ise 10-12 cm uzunluğa ve 150-250 g ağırlığa erişebilmektedirler. Göllerde yaşayan tatlısu

istakozlarının üçüncü yılın sonunda 8-9,5 cm uzunlukta iken cinsi olgunluğa eriştikleri tespit edilmiştir. Besin maddeleri bakımından fakir olan sularda istakozlarının geç kabuk değiştirdikleri ve cılız kaldıkları görülür (URL 3).



Şekil 1.4. *Astacus leptodactylus* 'un kabuk değişimi (URL 2)

Tatlısu istakozunun dış kabuğu prokutikül ve epikutikülden meydana gelir. Prokutikül tabakası endokutikula, ekzokutikula ve zarımsı bir tabakadan oluşur. Ekzokutikula melanin içerir ve krustaselerde temel pigmentasyon tabakasıdır. Kitin içermeyen epikutikulanın yapısında ise çok az yağ vardır. Dış kabuğun kalınlığı ve lipoproteinlerin tabakalaşması ile tatlısu istakozları su kaybından korunur. Tatlısu istakozlarının vücudunda dış iskeleti öne-arkaya hareket ettirmek için gözenek ve salgı kanalları bulunur. Kabuğun yapısında CaCO_3 ve kitin gibi maddeler bulunur (Şekil 1.4), (Lowery, 1988; Reynolds, 2002).

Tatlısu istakozları ayrı eşeyli hayvanlardır. Çiftleşmeleri 8-9,5 cm total boyda ve 3-4 yaşında gerçekleşir. Testis ve ovaryum çift olarak bulunur ve yumurtlamak suretiyle çoğalırlar. Genital açıklık (gonofor), erkeklerde V. çift pleopodların koksa denilen parçasının iç yüzeylerine, dişilerde III. çift pleopodlara açılırlar (Atay, 1997; Kumlu, 1998; Reynolds, 2002). Erkek ile dişi çiftleşir ve erkeğin spermatoforları dişinin ventral yüzeyinde depolanır. Kısa bir süre sonra yumurtalar dişi tarafından yumurtlanır. Döllenme dışarıda ve glair adı verilen mukus içerisinde gerçekleşir (Lowery, 1988; Harlıoğlu, 2000; Reynolds, 2002).

Tatlısu istakozlarında yumurta verimliliği türe, beslenme ve çevresel faktörlere göre değişmektedir (Barım, 2005). Tatlısu istakozlarında çiftleşme Ekim-Kasım aylarında su sıcaklığı 7-12°C iken olur. Yumurtaların gelişimi kış ve ilkbahar boyunca devam eder.

Dişiler yumurtalarını sıcak iklimlerde 5-6 ay, soğuk iklimlerde ise 6-7 hatta 8 ay taşırlar (Barım, 2005).

1.1.5. Tatlısu İstakozlarında Su Kalitesi

Tatlısu istakozlarının çevresel koşullara toleransları türlere göre değişmekle birlikte Tablo 1.1'deki değerler tropik türler dışında diğer tüm türler için geçerlidir (URL 3).

Tablo 1.1. Çevresel Koşullar ve Su Kalitesi İstekleri

Çevresel Koşullar		Değerler
Sıcaklık	Büyümleri için	14-22 °C
	Üremeleri için	6-13 °C
pH		6,5-8,5
Sertlik		50-200
Kalsiyum		> 5 ppm
Oksijen		> 6 ppm
Tuzluluk		0-5 ppm
İyonize olmayan amonyak		< 0,1 ppm

1.2. Demir (Fe)

1.2.1. Demir (Fe)'in Genel Tanımı ve Organizmadaki Dağılımı

Demir vücutta oksijen taşınmasından redüksiyon reaksiyona kadar hayati öneme sahip birçok reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli olan eser bir elementtir. Bu mineral maddenin organizmada metabolik olarak işlem gören dört yapısı vardır (Gözükara, 2001a).

a- Depo demir: Vücutta bulunan demirin %20'si proteine bağlı olarak "ferritin" yapısında olan depo demirdir. Depolandığı organ kemik iliği ve karaciğerdir. Vücutta kullanılmadığından dolayı depo edilen fazla demir ise "hemosiderin" yapısındadır.

b- Hemoglobin: Organizmada işlevsel olarak bulunan demirin %70'i eritrositlerin "hem" yapısında yer alır. Geri kalanın %5'i kasların miyoglobininde bulunur. Dolaşımdaki toplam miktarı ise 2,0-2,5 gramdır.

c- Transport demir: Bu demir yapısı plazmada taşıyıcı protein olan β -globüline bağlı “transferrin” dir.

d- Doku hücrelerindeki demir: Vücutta geri kalan yaklaşık 300 mg demir bütün hücrelere dağılmış halde enerji üretimindeki oksidatif enzim bileşiği olarak bulunur. Bunlar; elektron transportundaki demir-kükürt-protein yapısı, stokromlar, oksidatif fosforilasyon ve “katalaz, triptofanoksijenaz” ve diğerleri gibi karaciğer enzimleridir (Gözükara, 2001a).

1.2.2. Demirin Emilimi, Taşınması, Depolanması, Metabolizması ve Atımı

Vücut içerisinde demirin emilip taşınması, depolanması ve atılması özel bir sistemle yapılmaktadır. Vücuda “hem” ve “nonhem” (hem olmayan) yapısında olmak üzere iki şekilde alınır. Bu şekilde her iki yapının da emilimi birçok faktör tarafından etkilenir. Hayvansal kaynaklı besinlerde demirin de beşte üçü, tahıllardaki ve sebzelerdeki demirin tümü, nonhem yapısındadır. Hayvansal kaynaklı besinlerde geri kalan demir ise hem yapısındadır. Nonhem demir yapısı işlevsel olarak büyük organik moleküllere bağlı (Fe^{+2}) çok yavaş emilen ferrik (Fe^{+3}) bir demirdir. Mide asidi nonhem demiri daha çözünür olan ferros’a (Fe^{+2}) çevirir. Hayvansal protein değeri yüksek yemlerdeki hem demir metabolize edilmeden sadece hücrelerin parçalanmasıyla açığa çıktığından, doğrudan ince bağırsak mukozası ile temasla emilir. Vücutta sindirilen demirin %10-30’u duodenumdan emilmekte, emilmeyen %70-90’ının ise dışkıyla atıldığı hesaplanmıştır (Aksoy, 2014).

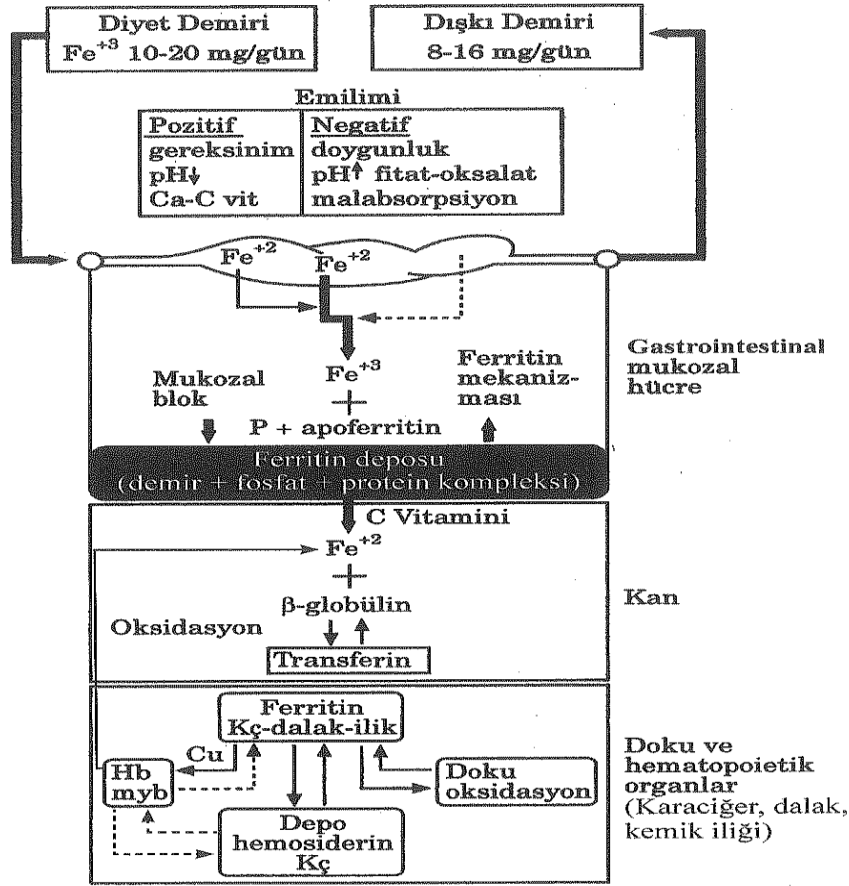
Vücutta demir genellikle amino asitlerle ince bağırsaktaki epitel doku hücrelerine taşınır. Burada demir indirgenerek üç değerlikten, iki değerliğe dönüşür. Ancak bulunduğu ortamda tekrar okside olmasından dolayı üç değerlikli hale gelir. Böylelikle hücre metabolizmasına girerek hem demirini oluşturur. Bu reaksiyonda üç alıcı madde rol alır;

1- İntrasellular taşıyıcı molekül (ICM)

2- Apoferritin

3- Epitel ferritin ve apoferritin

Vücuttaki minerallerin emilimini vücudun gereksinimi tarafından büyük oranda etkilenilir. Depolanan demir ne kadar az ise, emilim o kadar fazla olur. Üreme, büyüme ve mukozal ferritin düzeyinin düşüklüğü emilimi artırır. Dokuların doygunluğu ise emilimi azaltır (Aksoy, 2014).



Şekil 1.5. Demirin emilimi, taşınması, depolanması ve atımı (Aksoy, 2014)

Jejunumun, duodenumun ve mukozal hücrelerinde demir ferrik yapıya (Fe^{+3}) okside olur ve plazma proteini " β -globüline" diğer adıyla "transferrin"e bağlayarak depo edileceği kemik iliğine ve karaciğer taşınır. Transferinin demir bağlama kapasitesi %20-35'tir. Geri kalan demir plazmadaki diğer alıcılar tarafından tutulur (Şekil 1.5).

1.2.3. Demirin Metabolizması ve Dönüşümü

Her gün eritrositlerin ömrü %1 oranında sona erer. Bundan dolayı erişkin bireylerde günde hemoglobinden 19-24 mg demir açığa çıkar. Bu işlem dalağın ve karaciğer RE (retikülo endotelyal) hücrelerinde gerçekleşir. Porfirinin ve hemoglobinin yapısından ayrılan demir derhal transferrin ve serum ferritinine bağlanır. Hemoglobin sentezini tekrar oluşturmak için transferrin oluşan bu demiri kemik iliğine ve nerede demire gereksinim varsa oraya götürür. Serum ferritini ise; karaciğer ve diğer doku hücreleri tarafından tutulur. Bir kısım demir RE hücrelerindeki hepatositlere ve ferritine dahil olur. İntrasellüler ferritin

demiri, gerektiğinde kemik iliğine taşımak üzere mobilize edilir. Bu mobilizasyonun gerçekleşmesi için indirgenen demir bağlanmalı ve plazmaya transfer edilmelidir. Bu reaksiyonlarda plazma bakırı taşıyan “serruloplazmin” proteinin rolü olduğu ileri sürülmektedir. Ortamda eritrositlerden ayrılan demir RE tarafından tutulmadan hemoglobin veya porfirine transfer edilir ve sonra sırayla haptoglobine, hemopeksine ve sonra karaciğer parenkimal hücrelerine hepatosit ferritini oluşturmak üzere girer. Hemoglobinden ayrılan demirin dalakta hemosiderine ve ferritin girmesi içinde askorbik asidin gerekli olduğu varsayılmaktadır. Buna göre, karaciğerdeki depo hemosiderin fonksiyonu askorbat ve belki de E vitamini düzeyi ile etkilenecek değişmektedir (Aksoy, 2014).

1.2.4. Demirin İşlevleri

1.2.4.1. İmmün Sistem

Demir normal immün sistem işlevi için gereklidir. Mineralin hem yetersizliği hemde fazlalığı immün cevabı etkiler (Aksoy, 2014).

1.2.4.2. Kan Yapımı ve Elektron Transport Sistemi

Mineral kan hücrelerinden eritrositlerin yapısında bulunan hemoglobin ve molekülünün çekirdeğini oluşturur (Aksoy, 2014).

1.2.4.3. Redoks işlevi

Demir kolaylıkla değerlik değiştirebildiğinden dolayı elektron alarak redoks tepkimeleri katalize eder. Demir içeren bileşikler, bazı biyolojik aktivitelerde oksidasyon ve enerji metabolizmasına bağlı olarak reaktif veya redoks rolü oynarlar (Gözükara, 2001b).

Canlı organizmada demirin oksidatif gücü ve zararlı reaktivitesi demir taşıyan proteinin bağlanmasıyla veya diğer antioksidanların varlığıyla engellenir. Kontrol edilmediği zaman redoks tepkimeler yağ asitleri, protein ve nükleik asitlerde hücresel zararlara neden olabilirler. Demir “fantom” tepkimesini katalize eder ve bu olayda

süperoksit ile hidrojen peroksit çok reaktif serbest radikallere çevrilir. Serbest radikaller (hidroksi radikal gibi) peroksidasyona veya membran lipidlerinin çapraz bağının bozulmasına ve hücrenin yaşlanıp, ölmesine neden olurlar. Bu normal bir hücre yaşlanması olmasına karşın, oksidatif stresin artması olgunlaşmamış hücrenin erken yaşlanmasına neden olur (Gözükara, 2001a).

1.3. Su Canlılarında Demir İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Demirin su canlıları üzerine en büyük etkisi özellikle çevre kirliliği ile gündeme gelmektedir. Dünyada olduğu gibi ülkemizde ve yöremizde de bu kirliliğin etkileri hissedilir derecede kendini göstermeye başlamıştır. Örneğin; Keban Baraj Gölü'nde yapılan çalışmalarda Ağın Deri Fabrikası atıklarının suda oluşturduğu demir ve diğer ağır metal birikiminin burada yaşayan *Capoeta trutta* türü balıkların gelişimi ve üremelerini olumsuz yönde etkilediği (Canpolat, 2007), *A. leptodactylus*'ların etindeki vitamin değerlerini düşürerek, oksijenin toksik ürünleri sonucu oluşan oksidatif strese sebep olduğu belirlenmiştir (Barım vd., 2009; Barım ve Karatepe, 2010). Doğal ortamda meydana gelen ve su canlılarına yansıyan bu olumsuz etkiler su ürünleri yetiştiriciliği koşullarında da kendini göstermektedir. İşletmelerde meydana gelen hastalıklar, bu hastalıkları önlemek için kullanılan ilaçlar, yem yapımı ve depolanmasında meydana gelen aksaklıklar, balıkların boylanması, taşınması, aşılması gibi faktörlerde sularda metal kirliliği oluşturarak oksidatif stresin artmasına sebep olmaktadır (Winston ve Giulio, 1991; Gözükara, 2011).

Kültür şartlarında yapılan yetiştiricilikte; demir eksikliğinden meydana gelebilecek sonuçların oluşmasını önlemek ve besin değeri daha yüksek olan tatlısu istakozu elde etmek amacıyla rasyonlara ilave edilmesi gereken demir miktarının belirlenmesi çok büyük önem taşımaktadır. Ancak yapılan çalışmaların çoğunluğu demirin sudaki toksik etkinlik düzeyinin belirlenmesi üzerinedir. Örneğin; Sarıkaya vd. (2011)'nin *A. leptodactylus*'lar ($27,3 \pm 0,56$ g) üzerine fenitrothionun akut toksisitesini inceledikleri araştırmada 96 saatlik LC_{50} değeri $15,75 \mu\text{g L}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu maddenin canlı üzerinde yüksek oranda toksik olduğu tespit edilen çalışmada lipid peroksidasyonun indikatör olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. Çalışmada canlının juvenil formunda 24, 48 ve 96 saatteki LC_{50} değeri 1.9, 1.5 ve $0.8 \mu\text{g L}^{-1}$ idi. Bu çalışmada postlarva ve juvenil

karideslerin özellikle $0.3\mu\text{g L}^{-1}$ ve $0.8\mu\text{g L}^{-1}$ olarak değişen demir miktarlarının 96 saatlik LC_{50} değerlerine en hassas dönemleri; PL7 ve juvenil arasında idi.

Debnath vd. (2012), yaptıkları çalışmada aşırı demirin fenton reaksiyonunda bir katalizör olarak hareket ettiğini belirlemişlerdir. Bu sağlığa zararlı olan serbest radikalleri oluşturur. Çözünen demir toksisitesi için mümkün bir mekanizma sodyum dengesinin bozulmasıdır. Lameller epitelyumunun hipertrofi ve nekrozis, dış epitelyal tabakanın ayrılması, solungaç lamellasının erimesi gibi bazı patalojik değişimler aşırı demire maruz bırakılan teleostlarda gözlenilmiştir (Peuran vd., 1994). Maksimum total demir konsantrasyonu (EPA, 1986) demirin tespit edilen etkilerinden akuatik sistemi korumak için 1.0mgL^{-1} 'yi aşmamalıdır. Akua kültür uygulamaları için tanımlanan demir konsantrasyonu 0.01mgL^{-1} 'den azdır. Tripuranın farklı kısımlarında akuakültür suyunun yüksek demir içeriği ($0.14\text{-}3.96\text{ mg L}^{-1}$) sazan havuzlarında yüksek ölümlerin temel sebeplerinden biri olarak kaydedilmiştir. Demir hayvan yaşamının bütün görünüşünde fizyolojik anahtar bir rol oynar. Ferro demir akuatik hayvanlara demirin en toksik formlarından biridir. Kısmen ferro demir çoğu koşullar altında en hazır biyoyararlanımlı formdur (Bhattacharya ve Saha, 1991).

Wang vd. (2013), yaptıkları çalışmada mixotrophic *Chromochloris zofingiensis*'lerdeki yağ asidi ve astaksantin birikimi üzerine demirin ilavesinin büyümeyi azalttığı, fakat astaksantin ve toplam yağ asitlerinin üretimini arttırdığını bulmuşlardır. Demirin ($0.02\text{-}20\text{mM}$) ek bir ilavesinin kuru hücre biyokütlesinde büyük azalmaya sebep olduğu araştırmada hem astaksantin içeriği hem de astaksantin veriminin artan Fe^{+2} ile belirgin bir şekilde arttığı, 2mM düzeyindeki Fe^{+2} ile de düzelmeye meyillendiği tespit edilmiştir. Çalışmada Fe^{+2} 'nin düşük seviyesi daha büyük yağ asit birikimini desteklediği, pigment ve yağ asitlerinin kompozisyonunun analizinde optimal sonuçların 0.2 mM Fe^{+2} 'de görüldüğü, yağ asitleri arasındaki oranların Fe^{+2} ile güçlü bir şekilde değiştiği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, Fe^{+2} ile muamele edilen kültürde %27'den 32.8'e kadar doymamış yağ asitlerinde çarpıcı bir artma, %27.5'den 19.2'ye kadar önemli bir azalma meydana gelmiştir.

Yapılan araştırmada kullanılan demirin ($0.01, 0.1, 1, 10$ ve 100 mg L^{-1}) beş konsantrasyonu arasında yumurtlayan balıkların mortaliteleri, 0.01mgL^{-1} hariç bütün vakalarda görülmüştür. %100 ölüm 10 mg L^{-1} demir konsantrasyonunda gözlenilmiştir. Çözünen demir türleri düşündürücü bir şekilde toksik olmasına rağmen, ferrik demir (Fe^{+3}) balıklara özellikle tehlikeli olmamış, %100 ölüm 2 mg L^{-1} dozu ile tüm balıklarda

gözlenmiştir (Debnath vd., 2012). Aynı çalışmada yumurtalı catla, rohu ve mrigal için demirin 96 saat LC₅₀ değeri sırasıyla 0.59±0.07 mg L⁻¹, 0.73±0.06 mg L⁻¹ ve 0.30±0.06 mgL⁻¹ olarak kaydedilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar demir toksisitesinin üç balık türü arasında önemli derecede değiştiğini göstermiştir.

Qiao vd. (2013), yaptıkları çalışmada balığı da içeren daha yüksek yapılı hayvanların yaşam fonksiyonları için demirin esansiyel bir element olduğunu saptamışlardır. Bunun sebebini ise demirin oksijen taşıma ve hücre solunumunda önemli bir role sahip olması, özellikle balıkların solungaç membranı ve bağırsak mukozası içerisinde çözünür demiri absorbe edebilmeleri ile bağdaştırmıştır.

Gethardt (1992) tarafından yapılan çalışmada FeSO₄ olarak 10, 20 ve 50mg L⁻¹ demire balıkların (*Leptophlebia marginata*) 30 gün maruz bırakılmasından sonra besin tüketimi azalmıştır. Büyüme oranındaki bir azalma mevcut çalışmanın kısa dönem kısmi yaşam döngüsünde bazı tavırsal değişimler ile canlının yumurta bırakmasında gözlenmiştir. Bu çalışmada yumurtlama ağırlığı ve demir konsantrasyonu arasında negatif bir korelasyon görülmüştür. Alabalıklarda 12mg L⁻¹ ve daha fazla ilave edilen demirde büyüme gecikmiş, 6mg/L⁻¹ aşan sevilere maruz bırakılan balıklar ise hastalıklara ve hasarlara daha hassas olmuştur. Sonuç olarak suyun demir (FeSO₄) konsantrasyonunun güvenli seviye aralığı yumurta bırakan İMC için 0.12-0.17mg L⁻¹ olarak belirlenmiştir.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Araştırma Yeri ve Alanı

Bu araştırma 01 Temmuz 2014- 20 Ekim 2014 tarihleri arasında yapıldı. Uygulama, Fırat Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi binası içerisinde Araştırma Havuzları'nda gerçekleştirildi. Araştırmada onbeş adet fiberglas tekne kullanıldı.

2.1.2. Tatlısu İstakozu Materyali

Araştırmada kullanılan tatlısu istakozları (*A. leptodactylus*) Keban Baraj Gölü Aydıncık Yöresi'nden temin edildi. Her tekneye 20 adet erkek tatlısu istakozu yerleştirildi. Çalışma; bir kontrol, dört deneme grubu olmak üzere beş grup ve üç tekrar olarak yürütüldüğünden toplam 300 adet tatlısu istakozu kullanıldı. Farklı havuzlara stoklanan tatlısu istakozlarının ağırlıkları ve uzunlukları arasında istatistiksel olarak önemli bir farkın olmamasına dikkat edildi.

2.1.3. Yem Materyali

Bu araştırmada, tatlısu istakozlarının beslenmesi amacıyla kontrol (K) ve deneme yemlerinden (F1, F2, F3, F4) oluşan beş farklı rasyon kullanıldı. Kontrol rasyonu ilgili literatürlerin ışığında yaklaşık olarak %38-39 protein, %7-8 yağ içerecek şekilde Barım (2005), tarafından oluşturulan ve tatlısu istakozu gelişiminde olumlu sonuçların alındığı formüle göre düzenlendi. Oluşturulan kontrol rasyonunun $28,60 \text{ mg kg}^{-1}$ oranında demir içerdiği, yem maddelerinin içerisindeki demir miktarının varlığı ile hesaplandı. Deneme yemlerinin oluşturulması amacıyla kontrol yemine;

Deneme 1 (F1): $21,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$,

Deneme 1 (F2): $71,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$,

Deneme 1 (F3): $171,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$,

Deneme 1 (F4): $371,40 \pm 3,46 \text{ mg kg}^{-1}$ Fe ilavesi soya küspesi miktarının azaltılmasıyla düzenlendi (Tablo 2.1). Yemlerde $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ formunda demir kullanıldı (Qiao vd., 2013).

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan rasyonların yapısına giren yem maddelerinin bileşimi (%)

Yem Maddeleri	K
Balık Unu	35,9800
Soya Küspesi	38,6400
Buğday Unu	19,3000
Bitkisel Yağ	4,0000
Dikalsiyum fosfat	1,0000
Sodyum fosfat	0,4000
Vitamin karması ^a	0,5000
Mineral karması ^b	0,1800
Toplam	100,0000

(a) Vitamin Karması (Rovimix 107): Her 5 kg Rovimix 107’de aktif madde olarak: A vitamini 10,000,000 IU, D₃ vitamini 1,000,000 IU, E vitamini 100,000 IU, K vitamini 15,000 mg, B₁ vitamini 5,000mg, B₂ vitamini 15,000 mg, Niacin 150,000 mg, Calcium D-Pantothenate 50,000 mg, B₆ vitamini 10,000 mg, B₁₂ vitamini 20 mg, Folic Acid 3,000 mg, D-Biotin 1,000 mg, Choline Chloride 500,000 mg ve C vitamini 300,000 mg içerir.

(b) Mineral Karması (mg/kg): Mn 80,000, Fe 35,000, Zn 50,000, Cu 5,000, I 2,000, Co 400, Se 150.

2.1.4. Araştırmada Kullanılan Suyun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Araştırmada kullanılan suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri Tablo 2.2’de verildi.

Tablo 2.2. Araştırma suyunun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Özellikler	Miktarlar
Bulanıklık (NTU)	0
Sıcaklık (°C)	26
pH	8,28
Çözünmüş oksijen	6,69
Toplam sertlik	18 FS°
Toplam alkalinite	234 mgCaCO ₃ L ⁻¹
Çözünmüş katı madde	216 mg L ⁻¹
Kalsiyum	55 mg L ⁻¹
Magnezyum	12,30 mg L ⁻¹
Klorür	24,23 mg L ⁻¹
Amonyak	0 mg L ⁻¹

2.1.5. Diğer Araç ve Gereçler

Araştırmada, tatlısu istakozlarının canlı ağırlık tartımı 0,01 g hassasiyetli dijital terazi; total boyları 1 mm taksimatlı ölçüm tahtası; suyun sıcaklığı termometre; pH'ı ve oksijen miktarı 'Hanna-91140' model oksijen metre kullanılarak tespit edildi.

Laboratuvarlarda diseksiyon için makas, pens, petri kutuları, cam tüpler, otomatik pipet (50-1000µm), cam malzemeler (beher, mezür), kabuk ve hepatopankreasdaki MDA, SOD, GSH-Px, GSH miktarının belirlenmesinde spektrofotometre, mineral madde analizi için Mikro dalga fırını (Berghoff), mineral konsantrasyonlarının belirlenmesi için de AA WinLab yazılımı (PerkinElmer Corp., Norwalk, CT, ABD) ile birlikte bir Perkin Elmer AAnalyst 800 atomik absorpsiyon spektrometresi, 4.1 SP sürümü kullanıldı.

2.2. Metot

2.2.1. Araştırmanın Planlanması ve Kurulması

Bu çalışmada; tatlısu istakozları adet/m³ stoklama oranında tesadüf parselleri deneme planına göre, her havuza 20 tatlısu istakozu üç tekrarlı olmak üzere beş grup halinde stoklandı. Teknelerin taban kısmına havalandırmalar bırakılıp, gizlenebilmeleri için plastik borular (çap: 7 cm, boy: 25 cm) yerleştirildi. Yemlemeye geçilmeden önce K, F1, F2, F3 ve F4 teknelerine bırakılan tatlısu istakozlarının canlı ağırlığı ve total boyu tespit edildi.

Tatlısu istakozlarına verilecek yem miktarının belirlenmesinde; su sıcaklığı ön planda tutuldu (Çetinkaya, 1995). Bu amaçla yemleme yapılacak tatlısu istakozlarının ortalama canlı ağırlıkları ve suyun sıcaklığı (°C) ölçüldü. Sudaki çözünmüş oksijen miktarı (mg L⁻¹) ve pH değerleri iki haftalık periyotlarla belirlendi. Tespit edilen yem miktarı, tatlısu istakozlarına günde iki öğün halinde verildi (Velasco vd., 1999).

2.2.2. Araştırma Rasyonlarının Hazırlanması

Rasyonları oluşturan yem maddelerinin uygun bir karışım haline getirilebilmesi için öğütülerek partikül büyüklüğüne (1-4 mm) getirildi. Öğütülen yem maddeleri belirlenen oranlarda tartılarak homojen bir karışım sağlanacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra, belirlenen oranlarda hazırlanan demir suyun içerisinde iyice eritildi. Bu karışım

harmanlanarak homojen hale getirilmiş olan yem maddeleri ile karıştırıldı. Sodyum fosfat, dikalsiyum fosfat, avilamycine, antioksidan, vitamin ve mineral karmalarını içeren karışım, sıcaklığı 20°C olan suda eritildi. Bu karışım da demir ilave edilen yem maddelerine 1/1 oranında ilave edilen su ile birlikte karıştırıldı. Hamur haline getirilen yem kıyma makinesinden geçirilerek pelet haline getirilerek tepsilere yerleştirilip, soğutmalı etüvde 55 °C’de 48 saat bekletilerek kurutuldu (He vd., 1992; He ve Lawrence, 1993; Baker, 1997). Yemlerin büyüklükleri ise Tan ve Dominy (1997)’nin tavsiye etmiş oldukları pelet yem büyüklükleri esas alınarak hazırlandı.

2.2.3. Araştırma Rasyonlarının pH ve Suda Çözünürlük Sürelerinin Tespiti

Çalışmada kullanılan K, F1, F2, F3 ve F4 rasyonlarının pH düzeylerini tespit etmek amacıyla 100 cc distile suda (pH = 6,30, sıcaklık = 26,5°C) 10 g yem eritilip süspanse hale getirilerek dijital bir pH metre ile ölçüm yapıldı. Rasyonlarının suda çözünme süreleri ise, içerisinde 100 cc distile su bulunan cam beherlere bırakılan pelet yemlerin fiziksel yapılarının dağılması gözlenerek tespit edildi (AOAC, 1984).

2.2.4. Araştırma Dönemleri

Araştırma 4 örnekleme döneminde gerçekleştirildi.

- 1- Tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adepte edildiği dönem (AD) (07 Temmuz 2014)
- 2- Kontrol ve deneme yemleriyle yapılacak besleme esnasında tatlısu istakozunun kabuk değişimine hazırlandığı dönem (GD) (20 Eylül)
- 3- Tatlısu istakozunun kabuk değiştirdiği dönem (YD) (26 Eylül-03 Ekim)
- 4- Tatlısu istakozunun yeni kabuğunun sertleştiği dönem (KD) (20 Ekim)

Bu 4 farklı periyotta kontrol ve deneme gruplarından alınan tatlısu istakozları benzokain kullanılarak anestezi edildi. Bunu takiben otopsiyi yapılan tatlısu istakozlarının kas ve hepatopankreasları çıkarılarak folyolara sarılıp, analizler yapılincaya kadar -20 °C’de derin dondurucuda saklandı. Alınan kas ve hepatopankreas örneklerinde, aşağıda yöntemleri açıklanmış olan testler uygulandı.

2.2.5. MDA, SOD ve GSH Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Kas ve hepatopankreas örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında suyu alındıktan sonra tartıldı. Belirlenen miktardaki dokular %1.15'lik KCI içinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörde homojenize edilerek 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, SOD, GSH ve protein tayini gerçekleştirildi.

2.2.6. GSH-Px Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Doku örnekleri iki süzgeç kağıdı arasında kurutulduktan sonra tartılıp, %1.15'lik KCI içinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilerek 1.5 ml'lik ependorflara konulup soğutmalı santrifüjde (Nüve NF800R) 11.000 rpm'de 20 dakika santrifüje tabi tutuldu. Santrifügasyon işlemi sonucunda ortaya çıkarılan süpernatantlarda GSH-Px aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

2.2.7. Kullanılan Yöntemler

2.2.7.1. Dokuda Malondialdehit (MDA)'in Belirlenmesi

Prensip: Dokulardaki oksidatif stresin göstergesi olan MDA seviyesi Placer vd. (1996) tarafından modifiye edilen yöntemle göre belirlendi. Bu yöntemde ana prensip, lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyona girmesi ile geliştirilir. Oluşan reaksiyon sonucu MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks ortaya koymakta ve bu çözeltinin absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak okunup lipid peroksidasyonun seviyesi saptanmaktadır (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Dokulardakilipidperoksidasyon ölçümü için kullanılan kimyasal maddelerin uygulama sırası

	Kör(ml)	Standart (ml)	Doku (ml)
Örnek	-	-	0.25
Standart	-	0.25	-
Renk Ayırıcı	2.25	2.25	2.25

Metodun Ayıraçları

a) 2- Tiobarbitürik Asit (TBA): 0.67 g TBA 80 ml %10'luk perklorik asitte çözülüp 100 ml distile su ile distile edildi.

b) %10 Triklorasetik Asit (TCA): Distile su ile hazırlanıp oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklandı.

c) Temel Standart: 1,1,3,3Tetraetoxipropan (TEP)

d) Renk Ayıracı: 1 kısım TBA solüsyonu ile 3 kısım triklorasetik asit solüsyonu reaktif şişeye konulup 60 saniye magnetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ayıraç kullanıldığı gün hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Deney Tablo 2.3'deki sıraya göre yapıldı.

Tüplerde karışım sağlandıktan sonra kaynayan suyun (100 °C) içinde 20 dakika bekletildi. Daha sonra soğutma işlemi tamamlandı. Soğutulan tüpler 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu tüplerin üst faz absorbansı, spektrofotometre 532 nm'ye ayarlanarak okundu.

Dokuda lipid peroksidasyon düzeyinin hesaplanması

$$MDA = \frac{\text{Örneğin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

Dokudaki MDA değeri; nmol/g doku olarak hesaplanır.

2.2.7.2. SOD Aktivitesinin Tayini

Bu çalışmada SOD aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalinin nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Böylece üretilen süperoksit radikalinin NBT'ü indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlandırılır (Sun ve Oberley, 1988).

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgeme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmakta, ancak SOD varlığında enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksit

çevirmekte ve NBT indirgenmesi azalarak renk değişikliği meydana gelmektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olmaktadır. Oluşan formazonun 560 nm’de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Süperoksit dismutaz aktivite ölçümü

	Kör (ml)	Doku (ml)
Assay reaktifi	2.85	2.85
Süpernatant	-	0.10
Distile su	0.10	-
Ksantin Oksidaz	0.05	0.05

Metodun Ayıraçları

1. Assay Reaktif

- 0.3 mmol/L xanthine için**, 9.13 mg alınıp 200 ml distile suda çözülür.
- 0.6 mmol/L Na₂EDTA için**, 23 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- 150 µmol/L NBT için**, 12.3 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- 400 nmol/L Na₂CO₃ için**, 2.54 gr alınıp 60 ml distile suda çözülür.
- 1 g/L bovine serum albümine (BSA) için**, 30 mg alınıp 30 ml distile suda çözülür.

Oluşturulan çözeltilerin hepsi karıştırılır, (toplam 490 ml) koyu renkli şişede +4°C’de saklanır.

2. Ksantin Oksidaz (167U/L) için, mililitresinde 0.167U olacak şekilde 2M (NH₄)SO₄ içinde çözülür.

3. 2M (NH₄)SO₄ için, 2.64 g amonyum sülfat tartılır, bir miktar distile suda çözülür ve total hacim 10 ml’ye tamamlanır.

4. 0.8 mmol/L CuCl₂ için, 13.6 mg CuCl₂ alınıp bir miktar distile suda çözülerek total hacim 100 ml’ye tamamlanır.

Deneyin Yapılışı

SOD ölçümü için izlenmesi gereken prosedür Tablo 2.4'te verildi.

25 °C'de 20 dk süreyle inkübe edilerek, her iki tüpe de 1.0 ml CuCl₂ ilave edilip reaksiyon durduruldu. Distile suya karşı kör ve numunenin absorbanslarının ölçümü spektrofotometrede 560 nm'de gerçekleştirildi.

Dokuda SOD Aktivitesinin Hesabı

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Absorbans (Kör)} - \text{Absorbans (Örnek)})}{\text{Absorbans (Kör)}} \times 100$$

1 Ünite SOD: % 50'lik NBT inhibisyonu meydana getiren enzim miktarıdır.

$$\text{Ü/ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{\% 50 \text{ İnhibisyon}}$$

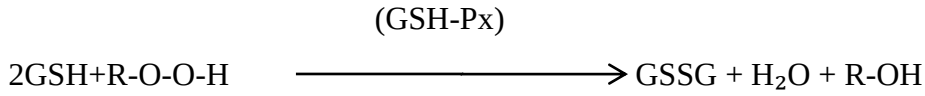
2.2.7.3. Dokuda GSH-Px Aktivitesinin Tayini

Dokulardaki GSH-Px aktivitesini tespit etmek için Beutler (1975)'in metodu kullanıldı (Tablo 2.5). Temel olarak; GSH-Px, redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) oksidasyonu hidrojen peroksit kullanarak katalizler.

Tablo 2.5. GSH-Px aktivitesinin ölçümü

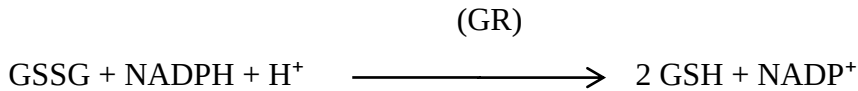
	Kör (µl)	Doku (µl)
Tris Tampon (pH:8.0)	100	100
0.1 M GSH	20	20
10 Ü/ml Glutatyon Redüktaz	100	100
2 mM NADPH	100	100
Homojenat	10	10
Distile su	670	660
37 °C'de 10 dakika preinkübe edilir.		
7 mM t-BOOH	-	10

Glutatyon Peroksidaz



GSSG' nin oluşum hızı GR reaksiyonu vasıtasıyla saptanır.

Glutatyon redüktaz (GR)



Reaksiyon ortamındaki t-butilhidroperaksidin (enzimlerin belirlenmesinde reaksiyonlara uygun peroksid substratıdır) her bir molekülünün indirgenmesi için bir mol GSSG meydana gelir. GSSG'nın GDH'a indirgenmesi ise GR enziminin katalizliğindeki reaksiyonla oluşur. Bu reaksiyonda GSSG'nin her bir molünün indirgenmesi için 1 mol NADPH'ın okside olması gerekir.

GSH-Px aktivitesi NADPH oksidasyonu gerçekleştikten sonra spektrofotometrik olarak 340 nm' de optik dansitideki düşüşten belirlenir.

Metodun Ayıraçları

- 1- **Tris tamponu (pH:8) için** 5mM EDTA içeren 1 M Tris-HCL tamponu hazırlandı.
- 2- **0.1 M Glutatyon (GSH) için** 0.3 g GSH 10 ml distile suda çözüldü. GSH solüsyonları kullanıldığı gün hazırlandı.
- 3- **10 Ü/ml Glutatyon Redükaz:** Temel prensip olarak mililitrede 10 ünite olacak şekilde distile suyla hazırlandı.
- 4- **NADPH (2mM) için** 0.05 g 30 ml distile suda çözüldü.
- 5- **7 mM t-bütilhidroperoksit (T-BOOH):** (%70'lik t-BOOH'in 1:1000'lik sulandırılmasından elde edildi). Enzimin tespit edilebilmesi için oluşacak reaksiyon oranı, güçlü bir şekilde t-BOOH konsantrasyonuna bağlıdır. 7 mM t-BOOH kullanıldığı gün hazırlandı (Tablo 2.5).

Oluşturulan karışımın optik dansitesindeki azalma spektrofotometre kullanılarak 340 nm'de saptandı. Absorbanslar 0'ıncı ve 2.5'inci dakikalarda not edildi.

Analiz sonucunda GSH-Px enzim aktivitesinin hesaplanması

$$\text{Ü/g protein} = \frac{\text{OD}_2 - \text{OD}_1}{t} \times \frac{1}{\text{protein (g/ml)}} \times \frac{1}{6.22 \times 0.01}$$

OD₂: 2.5 dakika sonundaki absorbans

OD₁: 0. dakikadaki absorbans

t: 2.5 dakika

1: küvetin toplam hacmi (ml)

0.01: Hemolizatın hacmi

6.22: 1µmol NADPH'in verdiği absorbans

2.2.7.4. GSH Tayini

Glutasyon düzey tayini Chavan vd. (2005)'nın yöntemine göre yapıldı. Bu metod 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoik asit eklendiğinde sülfidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması esasına dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir (Tablo 2.6).

Tablo 2.6. GSH ölçümü

	Kör (ml)	Doku (ml)	Standart (ml)
Süzüntü	-	2	-
Standart	-	-	2
Çöktürücü	1.2	-	-
Distile su	0.8	-	-
Na ₂ HPO ₄	8	8	8
DTNB	1	1	1

Metodun Ayıraçları

a. Çöktürücü Solüsyon için, 1.67 g galsiyel metafosforik asit, 0.2 g disodyum EDTA, 30 g NaCl tartılır 100 ml distile suda çözülür. +4 °C'de 3 hafta dayanıklıdır.

b. Fosfat Ayırıcı için, 0.3 M Na₂HPO₄ 1 L distile suda hazırlanır. +4 °C’de saklandı.

c. DTNB için, 40 mg DTNB % 1’lik Na-sitrat çözeltisi ile 100 ml’ye tamamlandı. +4 °C’de 13 hafta saklanır.

d. Glutasyon Standartı için, 2 mg/dl glutasyon.

Deneyin Yapılışı

Deney sırasında hemolizat üzerine çöktürücü solüsyondan 3 ml konuldu ve vortekslenerek 5 dk sonra filtre kâğıdından süzüldü. Deney ortamında elde edilen süzüntü kullanıldı.

Hazırlanan deney tüpleri vortekslendi ve 512 nm’de okundu.

Dokuda Glutasyon Aktivitesinin Hesabı

$$\text{GSH mg/dl} = \frac{(\text{Standartın Konsant.}) \times (\text{Örneğin OD}) \times (\text{Sulandırma Katsayısı})}{(\text{Standartın OD})}$$

mg/dl olan GSH değerleri µmol’e çevrilip, sonuçlar GSH µmol/g protein olarak verildi.

2.2.7.5. Biyolojik Sıvılarda Protein Tayini

Homojenatlardaki protein miktarı modifiye Lowry vd., (1951) yöntemine göre belirlendi. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yaptığından, her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildi ve mor-mavi renk şekillendi. Bu renk oluşumu 650 nm dalga boyunda okundu. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk arasında yüksek konsantrasyonlar için lineer bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılarak ölçümler gerçekleştirildi (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. Protein ölçümü

	Kör (ml)	Doku (ml)	Standart (ml)
Alkali Bakır Ayıracı	1.0	1.0	1.0
Örnek	-	1.0	-
Distile Su	1.0	-	-
Standart	-	-	1.0
Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dk oda ısısında bekletildi.			
Fenol Ayıracı	4.0	4.0	4.0

Metodun Ayıraçları

a) Alkali Bakır Ayıracı için, 10 g Na₂CO₃, 0.1 g Potasyum tartarat ve 0.05 g Bakır sülfat, 0.5 N NaOH içinde çözülür ve 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözelti oda ısısında 30 gün dayanıklıdır.

b) Fenol Ayıracı için, 2.0 N Folin-Ciocalteu-Fenol ayıracından 3.75 ml alınır, distile su ile 67.5 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltideki örnek sayısına göre çalışma anında günlük olarak hazırlanır.

c) Protein Standartı için, 50 µg/ml Sığır Serum Albumin (BSA)

Deneyin Yapılışı

Tüpler hemen vortekste iyice karıştırılır ve 5 dk 55 °C'de bekletilir. İnkübasyon sonrası musluk suyu altında hemen soğutulur, 650 nm'de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunur.

Hesaplama:

$$\mu\text{g protein / ml} = (\text{Örnek Abs.} / \text{Standart Abs.}) \times \text{Standart Konsant.} \times \text{Sulandırma}$$

Verilerin değerlendirmesinde “SPSS®21,0” paket programı (Duncan Testi) kullanıldı.

3. BULGULAR

Araştırmada kullanılan tatlısu istakozlarının başlangıç canlı ağırlık ve uzunlukları arasında istatistiksel bir farklılık olmamasına dikkat edildi. Ölçümler sonucunda ağırlık ve toplam uzunlukları Tablo 3.1’de olduğu gibi belirlendi. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda istatistiksel farkın olmadığı görüldü.

Tablo 3.1. *A. leptodactylus*’ların ağırlık ve toplam uzunlukları

	K	F1	F2	F3	F4
Ağırlık (g)	29,31±2,13	30,13±3,16	28,91±2,89	31,05±3,97	30,49±4,13
Uzunluk (cm)	10,00±0,32	10,08±0,63	10,12±0,56	10,53±0,84	10,42±0,91

Tatlısu istakozlarının bırakıldığı teknelerde düzenli aralıklarla yapılan analizlerle suyun ortalama sıcaklığı (°C), oksijen (mg L⁻¹) ve pH değerleri belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Araştırma süresince teknelerdeki suyun ortalama sıcaklık (°C), Oksijen (mg L⁻¹) ve pH değerleri

	°C	O₂	pH
Temmuz	26,80 ± 0,92	6,55 ± 0,45	8,30 ± 0,03
Ağustos	27,30 ± 0,95	6,09 ± 0,32	8,28 ± 0,04
Eylül	23,12 ± 0,75	6,76 ± 0,51	8,16 ± 0,09
Ekim	19,28 ± 0,94	7,39 ± 0,63	8,31 ± 0,10

Bu çalışmada, tatlısu istakozunun ihtiyacını karşılayan K rasyonu ve bu rasyona farklı oranlarda ilave edilerek oluşturulan F1, F2, F3 ve F4 rasyonu ile dört farklı dönemde beslenen tatlısu istakozlarının hepatopankreas ve kasındaki MDA, SOD, GSH-PX ve GSH düzeyleri belirlendi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adapte edildiği dönem (AD), vücutta gastrolitlerin oluştuğu dönem (GD), tatlısu istakozlarının kabuklarını bıraktıkları dönem (YD) ve kabuklarının sertleştiği dönem (KD)'de Kontrol (K), Deneme 1 (F1), Deneme 2 (F2), Deneme 3 (F3) ve Deneme 4 (F4) gruplarındaki tatlısu istakozlarının hepatopankreasındaki ortalama lipid peroksidasyon (Malondialdehit (MDA)(nmol g⁻¹ doku)), süperoksit dismutaz (SOD) (U mL⁻¹), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (U mL⁻¹) ve redükte glutatyon (GSH) (μmol mL⁻¹) düzeyleri

D	Prmt.	K	F1	F2	F3	F4	P
AD	MDA	144,66 ± 2,92 ^c					
	SOD	2,90 ± 0,11 ^a					
	GSH-Px	360,75 ± 28,15 ^a					
	GSH	1,01 ± 0,06 ^a					
GD	MDA	203,01 ± 7,45 ^{b/x}	143,02 ± 4,31 ^{b/y}	119,15 ± 5,63 ^{c/z}	104,69 ± 2,79 ^{b/z}	89,22 ± 3,77 ^{b/t}	***
	SOD	1,83 ± 0,06 ^{b/z}	1,68 ± 0,02 ^{b/z}	2,08 ± 0,02 ^{b/y}	2,19 ± 0,07 ^{b/y}	2,58 ± 0,07 ^{a/x}	***
	GSH-Px	294,08 ± 9,93 ^{b/y}	309,20 ± 8,31 ^{b/y}	322,38 ± 8,06 ^{a/y}	326,79 ± 10,13 ^{a/x/y}	357,11 ± 16,41 ^{a/x}	**
	GSH	1,00 ± 0,05 ^a	0,96 ± 0,05 ^a	0,95 ± 0,02 ^a	0,95 ± 0,04 ^a	0,98 ± 0,03 ^a	-
YD	MDA	300,72 ± 14,66 ^{a/x}	289,91 ± 8,67 ^{a/x}	234,03 ± 9,53 ^{a/y}	186,13 ± 6,81 ^{a/z}	100,53 ± 3,26 ^{b/t}	***
	SOD	0,90 ± 0,04 ^{c/z}	0,95 ± 0,05 ^{c/z}	1,03 ± 0,05 ^{c/z}	1,34 ± 0,02 ^{c/y}	1,97 ± 0,05 ^{b/x}	***
	GSH-Px	178,39 ± 10,92 ^{c/t}	185,21 ± 8,69 ^{c/z/t}	206,38 ± 7,59 ^{b/z}	241,69 ± 8,61 ^{b/y}	281,51 ± 5,64 ^{b/x}	***
	GSH	0,53 ± 0,03 ^{b/z}	0,56 ± 0,03 ^{b/z}	0,74 ± 0,02 ^{b/y}	0,91 ± 0,02 ^{a/x}	0,93 ± 0,03 ^{a/x}	***
KD	MDA	156,62 ± 10,64 ^c	142,68 ± 11,28 ^b	152,09 ± 12,18 ^b	161,07 ± 10,29 ^a	143,27 ± 12,56 ^a	-
	SOD	2,79 ± 0,09 ^a	2,68 ± 0,05 ^a	2,72 ± 0,02 ^a	2,86 ± 0,06 ^a	2,73 ± 0,09 ^a	-
	GSH-Px	361,54 ± 22,23 ^a	352,29 ± 21,16 ^a	340,16 ± 19,71 ^a	351,29 ± 18,26 ^a	355,16 ± 21,19 ^a	-
	GSH	1,00 ± 0,03 ^a	0,98 ± 0,02 ^a	0,96 ± 0,01 ^a	0,99 ± 0,03 ^a	0,99 ± 0,05 ^a	-
	PMDA	***	***	***	**	**	
	PSOD	***	***	***	***	***	
	PGSH-Px	***	***	***	**	**	
	PGSH	***	***	**	-	-	

Not:

D: Dönem, Prmt: Parametreler; İstatiksel Karşılaştırma; PMDA: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki MDA değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; PSOD: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki SOD değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; PGSH-Px: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki GSH-Px değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; Aynı sütunlarda farklı harfle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan Testi). PGSH: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki GSH değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; P: aynı satırdaki K, F1, F2, F3 ve F4'ün incelenen parametrelere göre karşılaştırılması; ([a, b, c]) ([x, y, z, t]) Aynı satırlarda farklı harfle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan Testi). -: p<0,05; *: p>0,05; **: p>0,01; ***: p>0,001.

Bu çalışmada dört farklı dönemde yeme farklı oranlarda demir ilave edilerek bir kontrol(K), dört deneme (F1, F2, F3, F4) grubunda bulunan tatlısu istakozlarının hepatopankreasındaki MDA, SOD, GSH ve GSH-Px düzeyleri araştırıldı. Adaptasyon döneminde henüz rasyonlara demir ilave edilmediği için sadece kontrol grubundan örnek alındı. Yapılan analizlerde hepatopankreas dokusunda oksidatif stres (OS) ile doğru orantılı olan MDA düzeyi; AD dönemindeki seviyesine göre GD döneminde arttığı, aynı

şekilde YD döneminde MDA düzeyinin en yüksek seviyede olduğu, tekrar kabuğunun sertleştiği dönemde MDA düzeyinin düşerek kabuk değiştirme döneminden önceki seviyelere geldiği görüldü. SOD, GSH ve GSH-Px seviyelerindeki değişimlerde MDA düzeylerindeki değişimle ters orantılı olarak değiştiği görüldü. Deneme gruplarında ise aynı dönemlerde yeme katılan demir ilavelerinin arttığında MDA seviyesinin düştüğü özellikle GD ve YD döneminde yeme 172-372 mg L⁻¹ oranında demir ilave edilmesinin kabuk değiştirme döneminde OS'i azalttığı saptandı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Tatlısu istakozlarının ortam şartlarına adapte edildiği dönem (AD), vücutta gastrolitlerin oluştuğu dönem (GD), tatlısu istakozların kabuklarını bıraktıkları dönem (YD) ve kabuklarının sertleştiği dönem (KD)'de Kontrol (K), Deneme 1 (F1), Deneme 2 (F2), Deneme 3 (F3) ve Deneme 4 (F4) gruplarındaki tatlısu istakozlarının kasındaki ortalama lipid (Malondialdehit (MDA)(nmol g⁻¹ doku)), süperoksit dismutaz (SOD)(U mL⁻¹), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) (U mL⁻¹) ve redükte glutatyon (GSH)(µmol mL⁻¹) düzeyleri

D	Prmt.	K	F1	F2	F3	F4	P
AD	MDA	29,07 ± 2,89 ^c					
	SOD	1,88 ± 0,09 ^a					
	GSH-Px	172,91 ± 13,01 ^a					
	GSH	0,51 ± 0,03 ^a					
GD	MDA	49,08 ± 2,18 ^{b/x}	38,82 ± 2,09 ^{b/y}	34,60 ± 1,63 ^{b/yz}	32,40 ± 1,15 ^{b/z}	30,36 ± 1,83 ^z	***
	SOD	1,13 ± 0,12 ^{b/z}	1,43 ± 0,06 ^{b/y}	1,67 ± 0,02 ^{b/x}	1,74 ± 0,04 ^{ab/x}	1,75 ± 0,03 ^x	***
	GSH-Px	179,44 ± 7,64 ^{a/z}	232,19 ± 7,4 ^{a/y}	251,74 ± 4,78 ^{a/x}	260,32 ± 4,90 ^{a/x}	261,98 ± 4,21 ^{a/x}	***
	GSH	0,40 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,01 ^{ab}	0,37 ± 0,02 ^c	0,39 ± 0,02 ^b	0,41 ± 0,03	-
YD	MDA	87,06 ± 3,2a/x	80,92 ± 4,09 ^{a/x}	69,73 ± 2,74 ^{a/y}	48,69 ± 3,65 ^{a/z}	35,68 ± 1,53 ^t	***
	SOD	0,58 ± 0,04 ^{c/t}	0,81 ± 0,05 ^{c/z}	0,89 ± 0,03 ^{c/z}	1,26 ± 0,03 ^{c/y}	1,78 ± 0,04 ^x	***
	GSH-Px	99,52 ± 3,33 ^{b/t}	108,78 ± 3,73 ^{c/t}	136,55 ± 3,42 ^{c/z}	197,85 ± 4,87 ^{b/y}	251,88 ± 8,05 ^{a/x}	***
	GSH	0,28 ± 0,02 ^{c/y}	0,36 ± 0,01 ^{bc/x}	0,40 ± 0,01 ^{bc/x}	0,38 ± 0,01 ^{b/x}	0,40 ± 0,01 ^x	***
KD	MDA	32,97 ± 3,24 ^c	35,36 ± 4,57 ^b	34,19 ± 5,13 ^b	33,22 ± 4,13 ^b	34,22 ± 5,02	-
	SOD	1,85 ± 0,06 ^a	1,80 ± 0,05 ^a	1,82 ± 0,06 ^a	1,84 ± 0,02 ^a	1,80 ± 0,09	-
	GSH-Px	167,20 ± 9,30 ^a	175,30 ± 8,22 ^b	169,13 ± 9,16 ^b	170,13 ± 7,16 ^c	172,16 ± 8,16 ^b	-
	GSH	0,48 ± 0,03 ^{ab}	0,45 ± 0,02 ^a	0,46 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,05 ^a	0,46 ± 0,03	-
	PMDA	***	***	***	**	-	
	PSOD	***	***	***	**	-	
	PGSH-Px	***	***	***	***	***	
	PGSH	***	*	**	*	-	

Not:

D: Dönem, Prmt: Parametreler; İstatiksel Karşılaştırma; P_{MDA}: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki MDA değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; P_{SOD}: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki SOD değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; P_{GSH-Px}: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki GSH-Px değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; P_{GSH}: AD, GD, YD ve KD dönemlerindeki GSH değerlerinin dönemlere göre karşılaştırılması; Aynı sütunlarda farklı harfle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan Testi).P: aynı satırdaki K, F1, F2, F3 ve F4'ün incelenen parametrelere göre karşılaştırılması; (^{a, b, c}) (^{x, y, z, t}) Aynı satırdaki farklı harfle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (Duncan Testi). -: p<0,05; *: p>0,05; **: p>0,01; ***: p>0,001.

Adaptasyon döneminde henüz rasyonlara demir ilave edilmediği için sadece kontrol grubundan örnek alındı. Yapılan analizlerde kas dokusunda oksidatif stres (OS) ile doğru orantılı olan MDA düzeyi; AD dönemindeki seviyesine göre GD döneminde arttığı, aynı şekilde YD döneminde MDA düzeyinin en yüksek seviyede olduğu, tekrar kabuğunun sertleştiği dönemde MDA düzeyinin düşerek kabuk değiştirme döneminden önceki seviyelere geldiği görüldü. SOD, GSH ve GSH-Px seviyelerindeki değişimlerde MDA düzeylerindeki değişimle ters orantılı olarak değiştiği belirlendi.



4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada dört farklı dönemde, yeme farklı oranlarda demir ilave ederek tatlısu istakozlarının beslenmesi yapıldı. Bu süre boyunca teknelerde oluşturulan şartların canlının yaşaması için optimal değerlere sahip olduğu görüldü. Köksal (1988), Skurdal ve Taugbol (2002), *A. leptodactylus*'un yaşadığı ortamlarda su sıcaklığının kabuk değiştirmek için 7-12 °C, üremeleri için 4-13 °C, büyümeleri için 14-22 °C, oksijenin en az 2 mg L⁻¹, pH'ın 6,5-8,5, kalsiyumun 5 mg L⁻¹'den az olmaması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ortalama su sıcaklığı, oksijen ve pH değerleri düzenli aralıklarla belirlenerek tablo halinde verilmiştir. Araştırmacıların belirttikleri değerler ile bu çalışmada elde edilen değerler arasında paralellik görülmektedir.

Çalışma süresince canlının ihtiyacını karşılayacak oranlarda besin içeriğine sahip kontrol yeminin optimal değerlere sahip olduğu görüldü. Rasyonlarda bulunması gereken ham protein ihtiyacını D'Abramo vd. (1985), Goddard (1988) *Procambarus acutus* 'larda %50,5; *Pacifastacus leniusculus* 'larda %39; *Astacus astacus* 'larda %40; Köksal (1988) *A. leptodactylus* 'larda %30,93; Ravi vd. (1999) *Cherax tenuimanus* 'larda %21,87 olarak saptamışlardır. Bu araştırmada kontrol yemindeki ham protein değeri yaklaşık olarak %37 olarak belirlenmiştir. Ham protein değerleri arasındaki bu farklılıkların farklı tür ve büyüklükteki örneklerin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kabuklu canlıların rasyonlarında bulunması gereken ham yağ miktarını Köksal (1988) *A. leptodactylus* 'larda % 7,82; Ackefors vd. (1992) *A. astacus* 'larda %7; Lee ve Lawrence (1997), Ravi vd. (1999) *C. tenuimanus* 'larda %6,02 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada kontrol yemindeki ham yağ miktarı yaklaşık olarak %7 olarak belirlenmiştir. Araştırmacıların belirttikleri değerler ile bu çalışma sonucu elde edilen ham yağ miktarı arasında uyum görülmektedir.

Bu çalışmada tatlısu istakozlarının antioksidan savunma ve OS düzeylerindeki değişimlerin kasa oranla hepatopankreasda daha yüksek olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu bulgular daha önceki çalışmalar ile uyumludur (Verlacer vd., 2008; Paital ve Chainy, 2013). Ana sindirim bezi olan krustasea hepatopankreasının yağda eriyen vitaminler içerdiği, vücudun metabolizmasını düzenlediği ve yüksek oksijen tüketimi sergilediği bilinmektedir (Bayir vd., 2011; Borkovic vd., 2008). Bu nedenle, O₂* ve H₂O₂ üretimi, hepatopankreasta kasa oranla daha fazla olabilir.

Çalışma sonucunda GD ve YD dönemlerinde MDA düzeyinin belirgin şekilde arttığı belirlendi. Bu, tatlısu istakozunun kabuk değişimi dönemine girmesi ile bağdaştırılabilir. Bu dönem kabuklu canlı biyolojisinin tüm yönlerini etkiler (hücrel metabolizması, fizyoloji ve davranış durumları). Özellikle metabolik aktivite yükselir. Çünkü dokularda (özellikle hepatopankreas) hemolenfde mineral madde birikintileri, glikoz, α -kitin-protein, gastrolit matriks proteini ve glikoprotein gibi organik rezervler kimyasal reaksiyonlar sonucunda dönüşümlere uğrar (Aiken ve Waddy, 1992; Ghanawi ve Saoud, 2012). Aiken ve Waddy (1992), doku metabolizmasının, kabuk değişimi sırasında oksijen tüketimini %1900'e kadar arttırabileceğini bildirmiştir. Yudkovski vd. (2010), kabuk değişiminin son dönemlerinde gastrolit diskinde oksidatif stresi etkileyen üç ilave gen değişiminin ve genlerin bir ön düzenlemesinin meydana geldiğini tespit etmiştir. Yukarıdaki açıklamalara paralel olarak MDA düzeylerindeki bu artış, kabuk değiştirme döneminde metabolik aktivitenin artması ile fizyolojik aktivitenin artması ve aşırı serbest radikal oluşumunun biyolojik moleküllere ve dokulara doğrudan hasar vermesi ile bağdaştırılabilir.

Decapod krustaselerin kabuk değiştirmesi sırasında ROS üretimi ve birikmesi arasındaki denge, endokrin kontrolündeki ecdysteroidler tarafından etkilenir. Ghanawi ve Saoud (2012), öncelikle kabuklu hayvanların kabuk değişimi sürecinin Y-organı tarafından sentezlenen ecdysteroidlerin ve kabuk değişimini engelleyen hormonun (MIH) negatif düzenleyici kontrolü altında karıştığı bildirmiştir. Ayrıca araştırmacılar, ecdystroidlerin seviyesinin kabuk değiştirme süresinin uzaması veya kısalması üzerine etkili olduğunu da vurgulamıştır. Bu ecdysteroidlere etki eden genleri özellikle hepatopankreasda metabolik ve transport enzimlerini kodlayan farklı genler ortaya çıkarmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar, endojen ve eksojen antioksidan savunma sistemlerinde genetik varyasyonun enzimatik antioksidan aktiviteyi etkileyebileceği kanıtlanmıştır. Bu tür çalışmalarda mitokondriyal zarların ve protein yapısının, ecdysteroit seviyesindeki değişiklikler sonucu ortaya çıkan antioksidan enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen değişikliklerin etkisiyle oluştuğu ve bu esnada ROS miktarının arttırabileceği saptanmıştır (Da Casto vd., 2012; Pisoschi ve Pop, 2015). Bu çalışmada da GD ve YD periyodunda dokulardaki oksidan ve antioksidan düzeylerinde belirgin artışlar ve azalmalar tespit edilmiştir.

Bu çalışmada yeme ilave edilen demirin MDA düzeyini azalttığı saptandı. Lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyindeki azalma ortamdaki antioksidan özellikteki madde ya da enzimlerin artması ile bağdaştırılabilir. Çünkü antioksidanın MDA oluşumu sırasında uygun çift bağına bir ROO* ilavesi, bu ROO*'nın

temizlenmesindeki ilk adımdır. Bu radikalın oksijene oksidasyonu yoluyla $O_2^{\cdot-}$ anyonuyla reaksiyona girerken antioksidan aktivitesi, peroksitlerin ($H_2O_2 / O_2^{\cdot-}$) oluşumunu ve Fenton yoluyla peroksitlerden türetilen $HO^{\cdot}$ gibi diğer reaktif oksijen türlerini önleme kapasitesinde ortaya çıkmaktadır (Fang vd., 2002). Bunun yanı sıra bir geçiş metali olarak demir atomu tamamlanmamış d-sub bir hücreye sahiptir. Sudaki demir anyonlara doğru serbest katyon (Fe^{+2}) oluşumuna yol açar. Oksijenin varlığında demir ferrik hidroksitin bir çökeltisini vermek için sudaki hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ile tepkimeye girebilir. Demir hafif asidik pH ortamlarında, nötr de ferrik forma çözülmüş oksijen tarafından oksidize edilir. Demirin en yaygın çözünen inorganik formu $Fe(OH)^{+2}$ gözlenmiştir ki ferrik hidroksit ($Fe(OH)_3$) büyük oranda dayanılabilir pH seviyesi ile akarsulardaki balık popülasyonlarını sınırlandırır ve bentik organizmaların total biyomaslarını azaltır. Demirin yüksek konsantrasyonu ($52,90 \text{ mg L}^{-1}$ 'e kadar) sudaki çözünebilirliği azaltabilir. Ayrıca azalan büyüme ve uzun süren stres ile sonuçlanan yavru ve juvenil devresinde besin algılarının bozulmasına sebep olur (Debnath vd., 2012). Sarıkaya vd. (2011), *A. leptodactylus*'ların hepatopankreasındaki MDA seviyesinin 5, 10, 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ dozdaki fenitrotyon ile azaldığını tespit etmişlerdir. Roméo ve Gnassia-Barelli (1997), *Ruditapes decussatus*'larda lipid peroksidasyon üzerinde demir gibi ağır metallerin büyük oranda etkili olduklarını bildirmiştir. Zhang vd. (2016), sazanlar üzerine demirin etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada demirin antioksidan savunma ve MDA üzerinde etkili olduğunu bu konuda daha geniş araştırmaların yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Wang vd. (2013) tarafından yapılan çalışmada ortamdaki demir miktarının canlıda MDA düzeyi üzerinde etkin olan astaksantin ve yağ asidi seviyesinde önemli bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada, hepatopankreas ve kasdaki SOD aktivitesi GD ve YD dönemlerine göre AD ve KD dönemlerinde daha düşüktü. Ancak yeme ilave edilen demir miktarı arttıkça SOD miktarının yükseldiği belirlendi. Rasyona farklı oranlarda ilave edilen demirin ($20\text{-}120 \text{ mg kg}^{-1}$) SOD miktarı üzerindeki etkisi Zhang vd., (2016) tarafından yapılan çalışmada *Ctenopharyngodon idellus*'larda da belirlenmiştir. Bu çalışmada demirin SOD üzerinde çok fazla etkili olmadığı ancak diğer antioksidanların düzeyini pozitif yönde arttırdığını saptamışlardır. Bu değişimler, peroksidasyona bağlı olarak O_2 anyonlarının ve H_2O_2 'nin aşırı üretilmesini nötralize etmek için ilk etapta farklı antioksidanın kullanılmasından kaynaklanabilir. Bununla birlikte, kasda SOD düzeyinde değişim hepatopankreasa göre daha düşüktü. Bunun sebebi ise metabolik aktivite sırasında bu dokuda oluşan O_2 'nin miktarındaki değişimden kaynaklanabilir (Pisoschi ve Pop, 2015).

Yapılan analizler sonucunda, tatlısu istakozlarının GSH-Px aktivitesini, SOD aktivitesine paralel olarak GD ve YD dönemlerine göre AD ve KD dönemlerinde daha düşüktü. Fakat yeme ilave edilen demir miktarı arttıkça GSH-Px miktarının yükseldiği saptandı. Bu enzimatik antioksidanların aksine kas ve hepatopankreasdaki GSH aktivitesinin tatlısu istakozlarında çok fazla değişim göstermediği belirlendi. Bu sonuç, metabolik aktiviteler sırasında O^{2-*} radikali üretiminin arttığı çalışma sonuçlarıyla uyumludur (Verlacer vd., 2008; Wilhelm Filho vd., 2001; Ayala vd., 2014; Barim-Oz ve Yilmaz, 2009). Yapılan çalışmalarda H_2O_2 'nin hücresel sistemde bulunan iki farklı enzim tarafından nötralize edildiği, bu enzimlerin ise GSH-Px ve CAT olduğu bildirilmiştir. Bu enzimlerin herbirinin H_2O_2 üzerindeki etkinliği farklıdır ve hücre içi H_2O_2 konsantrasyonunda, her biri farklı bir Km değerine sahip olduklarından bu enzimlerin hangisinin işlevsel olarak etkin olacağı dokunun özelliğine bağlıdır (Beytut vd., 2009). Çalışmamıza paralel olarak, Zhang vd., (2016) da yeme ilave edilen demirin *Ctenopharyngodon idellus*'larda GSH-Px miktarını arttırdığını tespit etmişlerdir. Daha önce de belirtildiği gibi GSH-Px seviyesindeki azalma, bu dokuda üreme periyodunda MDA seviyesinin yüksek olmasından dolayı OS'i azaltmak için mevcut enzimin kullanılmasından kaynaklanabilir. Dokulardaki GSH seviyesinde fazla olmayan değişimlerin sebebi ise özellikle birinci derecede SOD ve GSH-Px enzimlerinin kullanılmasıyla GSH'a radikallerin temizlenmesi için ihtiyaç duyulmamasıyla bağdaştırılabilir (Barim vd., 2009; Barim, 2009; Ayala vd., 2014; Barim-Oz ve Yilmaz, 2009).

Araştırma sonucunda tatlısu istakozunun ihtiyacına yönelik olarak hazırlanan kontrol rasyonuna farklı oranlarda demir katılmasının; tatlısu istakozunun (*A. leptodactylus*) özellikle kabuk değişimine hazırlandığı ve kabuğunu bıraktıktan sonraki yumuşak deriye sahip olduğu dönemlerde oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeyini istatistiksel açıdan önemli derecede azalttığı belirlendi. Ayrıca bu çalışmada tatlısu istakozlarının oksidatif savunması esnasında SOD ve GSH-Px'ın önemli derecede azaldığı, ancak GSH'ın çok fazla değişmediği saptandı. Elde edilen bu verilere paralel olarak kültür şartlarında yapılacak *A. leptodactylus* türü tatlısu istakozlarının yetiştiriciliğinde; kabuk değiştirme döneminde tatlısu istakozlarının yemine $172-372 \text{ mg kg}^{-1} \text{ Fe}$ ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) katılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Ackefors, H., Castell, J.D., Boston, L.D., Raty P. and Svensson, M.,** 1992. Standard experimental diets for crustacean nutrition research. II. growth and survival of juvenile crayfish *Astacus astacus* (Linne) fed diets containing various amounts of protein, carbohydrate and lipid. *Aquaculture*, **104**, 341-356.
- Aiken, D. E. and Waddy, S.L.,** 1992. The Growth Process in Crayfish. *Reviews in Aquatic Sciences*, **6 (3-4)**, 335-381.
- Akkuş, İ.,** 1995. Serbest Radikaller ve Fizyolojik Etkileri, 2. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- Aksoy, M.,** 2014. Beslenme biyokimyası. 4. Baskı, Hatipoğlu Yayınları, Ankara.
- Aksu, O., Adiguzel, R., Demir, V., Yildirim, N., Danabas, D., Seker, S., Seyhaneyildiz-Can, S. and Ates, M.,** 2014. Temporal changes in concentrations of some trace elements in muscle tissue of crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823), from Keban Dam Lake. *Hindawi Publishing Corporation Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014: Article ID 120401, 4p.
- Alpbaz, A.,** 2005. Su ürünleri yetiştiriciliği. Alp Yayınları, İzmir.
- AOAC,** 1984. Official methods of analysis (14th Ed). Association of Official Analytical Chemists. Inc. Arlington 1141 p.
- Atay, D.,** 1997. Kabuklu su ürünleri ve üretim tekniği. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, 1478, Ankara, 348 s.
- Ayala, A., Munoz, M.F. and Argüelles, S.,** 2014. Lipid Peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-Hydroxy-0-Nonenal. *Hindawi Publishing Corporation Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 31pp.
- Baker, R. T. M.,** 1997. The effects of dietary α -tocopherol and oxidised lipid on postthaw drip from catfish muscle. *Animal Feed Science Technology*, **65**, 35-43.

- Barım, Ö.**, 2005. Keban Baraj Gölü'nde yaşayan tatlısu istakozu (*astacus leptodactylus* esch. 1823) rasyonuna farklı oranlarda ilave edilen vitamin e'nin etkileri. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 73s.
- Barım, O.**, 2009. The effects of dietary vitamin E on theoxidative stress and antioxidant enzyme activities in their tissues and ovarian egg numbers of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschschotlz, 1823). *Journal of Animal and Veterinary Advences*, **8(6)**, 1190-1197.
- Barım, Ö. and Karatepe, M.**, 2010. The effects of pollution on the vitamins a, e, c, β carotene contents and oxidative stress of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**, 138-142.
- Barım, Ö., Benzer, F., Erisir, M. and Dorucu, M.**, 2009. Oxidant and antioxi-dan status of tissues of freshwater crayfish (*astacus leptodactylus* esch., 1823) from different stations in the Keban Dam Lake. *Fresenius Environmental Bulletin*, **18**, 6.
- Barım-Oz, O. and Yilmaz, S.**, 2009. The determination of effects vitamin E, C, astaxanthin and β -carotene on oxidative stress in some tissues of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823) in moulting period. *E-Journal of New World Sciences Academy*, **4(3)**, 39-46.
- Bayir, A., Sirkecioglu A.N., Haliloglu, H.I., Aksakal, E., Gunes, M. and Aras, N.M.**, 2011. Influence of season on antioxidant defense systems of *Silurus glanis* Linnaeus (Siluridae) and *Barbus capito capito* Gldenstdt (Cyprinidae). *Fresen. Environ. Bull.*, **20(1)**, 3-11.
- Bell, B. J. G., Cowey C. B., Adron J.W. and Shanks, A. M.**, 2002. Some effects of vitamin e and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition*, **53**, 149-157.
- Beutler, E.**, 1975. Red Cell Metabolism, In: Beutler, E., (Ed.): A Manual of Biochemical Methods, Grunef and Strottan, New York, pp. 67-69.

- Beytut, E., Barim, Ö. and Kamiloglu, N.N.,** 2009. Different levels of dietary DL- α tocopheryl acetate modulate the antioxidant defence system in the hepatopancreas, gills and muscles of the freshwater crayfish, *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **8(6)**, 1177-1184.
- Bhattacharya, T. and Saha, R.K.,** 1991. Water quality of Agartala, final report. Tripura State Pollution Control Board, **24**, 43.
- Bjørneboe, A., Bjørneboe G-E Aa. and Drevon C. A.,** 1990. Absorption, transport and distribution of vitamin E. *J. Nutr.*, **120**, 233-242.
- Borković, S.S., Pavlović, S.Z., Kovačević, T.B., Štajn, A.Š., Petrović, V.M. and Saičić, Z.S.,** 2008. Antioxidant defence enzyme activities in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (in hepatopancreas, gills and muscle of Spiny cheek crayfish (*Orconectes limosus*) from the River Danube. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **147**, 122-128.
- Canpolat, Ö.,** 2007. Keban Baraj Gölü'ndeki kirletici kaynaklarının su kalitesi ve *capoeta trutta* (heckel, 1843)'nın üreme biyolojisi ve gelişimi üzerindeki etkileri. *Doktora Tezi*, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 336s.
- Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A. and Ingole, D.,** 2005. Reduced Glutathione: Importance of Specimen Collection, *I J of Clin Biochem*, **20(1)**, 150-152.
- Chen, H-Y.,** 1998. Nutritional requirements of the black tiger shrimp: *Penaeus monodon*. *Reviews in Fisheries Science*, **6**, 79-95.
- Conklin, D.E,** 1995a. Digestive physiology and nutrition. In: *Biology of the Lobster Homarus americanus*, (J. Robert Factor, eds.). *Academic Press*, 441-463.
- Conklin, D.E,** 1995b. Vitamins. In: *Crustacean Nutrition. Advances in World Aquaculture*. (L.R. D'Abravo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama, eds), **6**, 123-149.
- Cuzon, G., Guillaume, J. and Cahu, C.,** 1994. Composition, preparation and utilization of feeds for crustacea. *Aquaculture*, **124**, 253-267.
- Çetinkaya, O.,** 1995. Balık besleme. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 9, Van, 137 s.

- D'Abramo, L.R.D, Wright, J.S., Wright, K.H., Bordner, C.E. and Conklin, D.E.,** 1985. Sterol requirements of cultured juvenile crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Aquaculture*, **49**, 245-255.
- D'Abramo, L.R.D. and Conklin, D.E.,** 1995. New developments in the understanding of the nutrition of penaeid and caridean species of shrimp. *In: World Aquaculture Society, (C.L. Browdy and J.S. Hopkins, eds.)*, 95-108.
- D'Abramo, L.R.D. and Robinson, E.H.,** 1989. Nutrition of crayfish. *Aquatic Science*, **1(4)**, 711-728.
- Da Costa, L.A., Badawi, A. and El-Soheby, A.,** 2012. Nutrigenetics and Modulation of oxidative stres. *Ann Nutr Metab*, **60(3)**, 27-36.
- Daloğulları, F.,** 2012. Tatlısu istakozlarında (*astacus leptodactylus* esch. 1823) amonyağın toksik etkilerinin belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 89s.
- Debnath, M., Saha, R.K., Kamilya, D., Saikia, D. and Saha, H.,** 2012. Effects of water borne iron on spawn of indian majör carps (*Catla catla*(Ham.), *Labeo rohita*(Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.)). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **89**, 1170-1174.
- EPA,** 1986. Environmental protection agency. Quality criteria for water 1986. Office of Water Regulations Standarts Washington, DC 20460. Water, EPA 440/5-84-001.
- Fang Y-Z, Yang S. and Wu G.,** 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-879.
- Gerhardt, A.,** 1992. Effects of sub-acute doses of iron (Fe) on *Leptpphlebica marginata* (Insecta: Ephemeroptera). *Freshw. Biol.*, **27**, 79-84.
- Ghanawi, J. and Saoud, I.P.,** 2012. Molting, Reproductive Biology, and Hatchery Management of Redclaw Crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martes 1868), *Aquaculture*, **358-359**, 183-195.
- Goddard, J.S.,** 1988. Food and Feeding. *In: Freshwater Crayfish: Biology. Management and Explaitation* (Holdich D. M. and Lowery, R. Eds), Chapman and Hall, London, 45-166.
- Gökalp., H.Y., Nas, S. and Certel, M.,** 1992. Biyokimya 1- Temel yapılar ve kavramlar. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayın No:772, 466s.
- Gözükara, E.M.,** 2001a. Biyokimya. Cilt-1, 4. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.

- Gözükara, E.M.,** 2001b. Biyokimya. Cilt-2, 4. Baskı, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- Gözükara, E.M.,** 2011. Biyokimya. Nobel tıp kitapevi-İstanbul, ISBM:978-975-420-7842, 908s.
- Guoda, M.,** 1999. A comparative study of physiological and biochemical indices of native European and Alien species of crayfish in Lithuania. *Frashwater Crayfish*, **12**, 205-220.
- Harlioğlu M. M.,** 2004. The present situation of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) in Turkey. *Aquaculture*, **230**, 181-187.
- Harlioğlu, M.M.,** 2000. *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823)'un çiftleşme ve yumurtlama davranışı ve stoklama yoğunluğunun çiftleşme ve yumurtlamaya etkisi. *Fırat Üniv. Fen ve Müh. Bil. Dergisi*, **12(1)**, 307-312.
- He, H. and Lawrence A. L.,** 1993. Vitamin E requirement of *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, **118**, 245-255.
- He, H., Lawrence L. and Liu R.,** 1992. evaluation of dietary essentiality of fat-soluble vitamins, A, D, E, and K for Penaeid Shrimp (*Penaeus vanamei*). *Aquaculture*, **103**, 177-185.
- Holdich, D. M. and Reeve, I. D.,** 1988. Functional morphology and anatomy. in: freshwater crayfish: biology. Management and Explaitation (Holdich D. M. and Lowery, R. Eds). Chapman and Hall, London, 11-51.
- Huner, J.V., Meyers,S.P. and Avault, J.W.,** 1975. Response and growth of freshwater crayfish to an extruded water-stable diet. *Freshwater Crayfish*, **2**, 149-157.
- Jover, M., Fernandez-Carmona, J., Rio, M.C.D. and Soler, M.,** 1999. Effect of feding cookedextruded diets, containing different levels of protein, lipid and carbohydrate on growth of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Aquaculture*, **178**, 127-137.
- Jussila, J.,** 1997a. Carapace mineralization and hepatopancreatic indices in natural and cultured populations of marron (*Cherax tenuimanus*) in Western Australia. *Marine and Freshwater Research*, **48(1)**, 67-72
- Jussila, J.,** 1997b. Physiological responses of Astacid and Parastacid crayfishes (Crustacea: Decapoda) to conditions of intensive culture. Universty of Kuopio, Austraaia, 140 p.

- Kılınç, K.**, 1985. Oksijen radikalleri: Üretilmeleri, fonksyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi*, **10**, 60-89.
- Kinter, M.**, 1995. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *Journul of Chromatography B., Review*, **671**, 223-236.
- Köksal, G.**, 1988. *Astacus leptodactylus* in Europe. İn: Freshwater Crayfish: Biology, Management and Explaitation, (Holdich D. M. and Lowery, R., eds.), Chapman and Hall, London, 365-400 pp.
- Kumlu, M.**, 1998. Karides, istakoz ve midye yetiştiriciliği. Çukurova Üniv. Su Ürün. Fak., Ders Kitabı No: 6, 340 s.
- Kumlu, M.**, 2001. Karides, İstakoz ve Midye Yetiştiriciliği Ders Kitabı, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No : 6, 305s.
- Lee, P.G. and Lawrence, A.L.**, 1997. Digestibility. İn: Crustacean Nutrition. *Advances in World Aquaculture*, (L.R. D'Abrabo, D.E. Conklin and D.M. Akiyama eds.), **6**, 194-237.
- Lowery, R.S.**, 1988. Growth, Moulting and Reproduction. İn: Freshwater crayfish: Biology, Management and Explaitation (Holdich D. M. and Lowery, R. Eds). Chapman and Hall, London, 83-113pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.**, 1951. Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.A
- Lushchak, V.**, 2012. Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants. *Agricultural and Biological Sciences*, ISBN 978-953-51-0553-4, Published: May 2: 2012 Under CC BY 3.0 License.
- Macpherson, A.**, 1994. Selenium, vitamin E and biological oxidation,. İn Recent Advanceec in Animal Nutrition (Edited by Cole D.S. Oxford and Garniworth P.), Butterworth and Heiremann, 3-30 pp.
- Mazlum, Y. ve Yılmaz, E.**, 2012. Tatlısu istakozuların biyolojisi ve yetiştiriciliği. *Mustafa Kemal Üniversitesi Yayınları*: 34, Hatay, 120s.
- Murray, R.K., Mayes, P.A. Granner, D.K. ve Rodwell, V.W.**, 1993. Harper'ın biyokimyası. Barış Kitabevi, İstanbul, 913s.
- New, M.B.**, 1976. A review of dietary studies with shrimp and prawns. *Aquaculture*, **9**, 101-144.

- Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E.,** 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**, 57-149.
- Paital, B. and Chainy, G.B.N.,** 2013. Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **87**, 33-41.
- Peuran, S., Vuorinen, P.J., Vuorinen, M. and Hollender, A.,** 1994. The effects on iron, humic acids and low pH on the gills and physiology of brown trout (*Salmo trutta*). *Ann. Zool. Fennici*, **31**, 389-396.
- Pisoschi, A.M. and Pop, A.,** 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**, 55-74.
- Placer, A.Z., Linda, L.C. and Johnson, B.,** 1996. Estimation of product of lipid peroxidation (malondialdehyde) in biochemical system. *Anal. Biochem.*, **16**, 359-364.
- Qiao, Y.-G., Tan, B.-P., Mai, K.-S., Ai, Q.-H., Zhang, W.-B. and Xu, W.,** 2013. Evaluation of iron methionine and iron sulphate as dietary iron sources for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture Nutrition*, **19**, 721-730.
- Ravi, F., Brenton, K. and Louis, E.,** 1999. Effect of a diet supplemented with cod liver oil and sunflower oil on growth, survival and condition indices of juvenile *Cherax tenuimanus* (Smith). *Freshwater Crayfish*, **12**, 478-493.
- Reynolds, J.R.,** 2002. Growth and reproduction. In: Biology of freshwater crayfish (Holdich D.M., eds.). *Iowa State University Press*, 153-191.
- Roméo, M. and Gnassia-Barelli, M.,** 1997. Effect of heavy metals on lipid peroxidation in the mediterranean clam *Ruditapes decussatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **118C (1)**, 33-37.
- Sarıkaya, R., Sepici-Dinçel, A., Karasu-Benli, A.Ç., Selvi, M. and Erkoç, F.,** 2011. The acute toxicity of fenitrothion on Narrow-Clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) in association with biomarkers of lipid peroxidation. *J. Biochem. Molecular Toxicology*, **25(3)**, 169-174.
- Shiau, S-Y.,** 1998. Nutrient requirements of penaeid shrimps. *Aquaculture*, **164**, 77-93.

- Skurdal, J. and Taugbol, T.**, 2002. *Astacus*. In: *Biology of Freshwater Crayfish*, Holdich, D.M. (Ed.), Blackwell Science Ltd., UK, 467-510.
- Sun, Y. and Oberley, W.L.**, 1988. Li Y.: A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, *Clin. Chem.*, **34**, 97-500.
- Suprunovich, A.W., Kadriuk, R.P., Petkevich, T.A.,Stepaniuk, I.A., Lisovskaya, W.L. and Antsupova, L.V.**, 1983. Biochemical characteristics of the dniester long-clawed crayfish of astacidae family. *Freshwater Crayfish*, **5**, 490-533.
- Tan, R.K.H. and Dominy, W.G.**, 1997. Commercial pelleting of crustacean feeds. In: *Crustacean Nutrition*, (D'Abramo, L.R., Conklin, D.E. and Akiyama, D.M.ed.), World Aquaculture Society, Louisiana, 520-549.
- URL 1.**, 2013. <http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=3143>.
- URL 2.**, 2017. <http://www.atillaalpbaz.com/?o=3&y=139> .
- URL 3.**, 2017. http://esuf.sdu.edu.tr/tr/genel/tatlisu_istakozulerin-biyolojisi-2915s.html .
- Velasco, M., Lawrence, A.L. and Castille, F.L.**, 1999. Effect of variations in daily feeding frequency and ration size on growth of shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone), in zero-water exchange culture tanks. *Aquaculture*, **179**, 141-148.
- Verlecar, X.N., Jena, K.B. and Chainy, G.B.N.**, 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **76**, 745-752.
- Vogt, G.**, 2002. Functional anatomy. In: *Biology of Freshwater Crayfish*, (Holdich, D.M., eds.), Iowa State University Press, 53-150.
- Vonk, H., J.**, 1960. Digestion and metabolism. In: *The Physiology of Crustacea*, (Edited by Talbot H., Waterman), Department of Zoology, Yale University, London, **1**, 291-316.
- Wang, X. and Quinn P. J.**, 1999. Vitamin E and it's function in membranes. *Progress in Lipid Research*, **38**, 309-336.
- Wang, Y., Liu, Z. and Qion, S.**, 2013. Effects of iron on fatty acid and astaxanthin accumulation in mixotrophic *Chromochloris zofingiensis*. *Biotechnol Lett*, **35**, 351-357.

- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gáspari, C., Claudio, F.D., Torres, M.A. and Magalhães, A.R.M.,** 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, **203**, 149-158.
- Winston, G. W. and Giulio, R. T. D.,** 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, **19**, 137-161.A.
- Yudkovski, Y., Glazer, L., Shechter, A., Reinhardt, R., Chalifa-Caspi, V., Sagi, A. and Tom, M.,** 2010. Multi-transcript expression patterns in the gastrolith disk and the hypodermis of the crayfish *Cherax quadricarinatus* at premoult. *Comperative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, **5(2)**, 171-177.
- Zhang, L., Feng, L., Jiang, W.-D., Liu, Y., Jiang, J., Li, S.-H., Tang, L., Kuang, S.-Y. and Zhou, X.-Q.,** 2016. The impaired flesh quality by iron deficiency and excess is associated with increasing oxidative damage and decreasing antioxidant capacity in the muscle of young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Nutrition*, **22**, 191-201.

ÖZGEÇMİŞ

Malatya ilinde 1980 yılında doğdum ilk ve ortaokulu Malatya ilinde tamamladım. Lise öğrenimimi Adana ilinde tamamladıktan sonra 2000 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde lisans eğitimine başladım ve 2005 yılında mezun oldum. 2012 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Halen bu bölümde öğrenciyim. Evli ve iki çocuk babasıyım.

