



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİTİN (2,4-D)
KILIÇKUYRUK (*Xiphophorus hellerii*) BALIKLARININ
BAZI DOKULARINDA ASETİKLORİNESTERAZ (AChE)
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

GAMZE TUĞÇE TURAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL, 2012



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİTİN (2,4-D)
KILIÇKUYRUK (*Xiphophorus hellerii*) BALIKLARININ
BAZI DOKULARINDA ASETİKLORİNESTERAZ (AChE)
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

GAMZE TUĞÇE TURAN
(520110014)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Biyoloji Programı

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN

İSTANBUL, 2012

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında bana her konuda, her türlü bilgi, teşvik, özveri, katkı ve yardımlarını esirgemeyen ve tüm birikimlerini bana yansıtan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN'a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ DUMAN, Sayın Yrd. Doç. Dr. Şener AKINCI ve Sayın Dr. Nüzhet Cenk SESAL' e şükranlarımı sunarım.

Labaratuvar çalışmalarım sırasında akvaryum ekipmanımı tam ve eksiksiz olmasını sağlayan eniştem Özen ÇELİKÖRS'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam süresince özellikle solungaç ve karaciğer dokularının eldesinde bana büyük katkıları olan çok sevdiğim arkadaşım Uzm. Biyolog Güllü KAYMAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan desteğini benden esirgemeyen Burak ACİCBE'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, her konuda yanımda olan ve bugünlere gelmemi sağlayan annem Aliye TURAN babam Erol TURAN ablam Gonca ÇELİKÖRS'e teşekkürü bir borç bilirim.

Kasım,2012

Gamze Tuğçe TURAN

İÇİNDEKİLER/TABLE OF CONTENTS

	SAYFA
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ/INTRODUCTION	1
1.1. Tezin Amacı	4
1.2. Literatür Araştırması	7
2. MATERYAL VE YÖNTEM/MATERIAL AND METHOD	15
2.1. Enzimlerin Genel Özellikleri	15
2.1.1. Asetilkolinesteraz Enzimi	17
2.2. Pestisitler	18
2.2.1. Kirleticilerin Sucul Canlılara Etkileri	22
2.3. 2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetikasit)	25
2.4. Kılıç Kuyruğu Balığı ve Özellikleri	26
2.4.1. Sistematikteki Yeri	26
2.4.2. Morfolojisi	26
2.4.3. Balık Solungaçlarının Yapı ve İşlevleri	27
2.4.4. Balıklarda Endokrin Sistem	32
2.5. Araştırma Araçları	34
2.5.1. Kullanılan Kimyasallar	34
2.5.2. Kullanılan Cihazlar	35
2.5.3. Deney Materyali	36
2.5.4. Araştırma Yöntemi	37
2.5.5. Biyokimyasal Parametreler İçin Kullanılan Tayin Yöntemleri	41

3. BULGULAR VE TARTIŞMA/RESULTS AND DISCUSSION	47
3.1. Deneysel Sonuçlar	47
3.1.1. Solungaçlar ve Karaciğerde Protein Tayini	48
3.1.2. Solungaçlar ve Karaciğerde AChE Tayini	51
3.2. Tartışma	59
4. SONUÇLAR/CONCLUSIONS	61
KAYNAKLAR	27
EKLER	29
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetik asit) KILIÇKUYRUK (*Xiphophorus helleri*) BALIKLARININ BAZI DOKULARINDA ASETİLKOLİNESTERAZ (AChE) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu araştırmada, pestisit grubu bir herbisit olan 2,4 Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren ortamda ergin Kılıç kuyruk balıklarının (*Xiphophorus helleri*) karaciğer ve solungaç dokularında Asetilkolin esteraz (AChE) enzim aktivitesine etkileri incelenmiştir. Kontrol grubu dışında balıklar 96 saat süresince 2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetik asit) LC50 değerinin %80'inin etkisine bırakılmıştır. 2,4-D (2,4 Diklorofenoksiasetik asit) toksik potansiyelini belirlemek amacıyla solungaç ve karaciğer dokularında Asetilkolin esteraz (AChE) enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen artışlar grafiklerle şematize edilmiştir. Asetilkolin esteraz (AChE) enziminde ki artışın nedeni ise; 2,4 Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) herbisitinin Asetilkolin esteraz (AChE) enziminin yapısını bozarak düzgün çalışmasını engellemesidir.

Protein miktarlarında kontrol grubuna oranla diğer gruplarda artış gözlenmiştir. Kontrol grubu hariç diğer gruplara verilen 2,4-D'nin (0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm) AChE aktivitesini kontrol grubuna göre arttırdığı gözlenmiştir.

ABSTRACT

DETERMINATION OF AChE AKTİVATED AFTER EXPOSED TO DIFFERENT DOSES OF 2,4-D (2,4 DİKLOROFENOKSIASETİK ASİT) IN SWORDTAIL FISH (*Xiphophorus hellerii*)

In the present, a group of pesticides with herbicides 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) medium containing Swordtails adult fish (*Xiphophorus hellerii*) tissue acetylcholine esterase (AChE) enzyme activity were investigated. Outside of the control group during 96 hours fish 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) LC50 values were 80% of the effect. 2,4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) in order to determine the potential for toxic enzyme activity of AChE gill and liver tissues was determined using spectrophotometric methods. Increases are schematically depicted graphically determined. The reason for the increase in AChE enzyme, 2,4-D herbicide to help prevent the proper operation of disturbing the structure of the enzyme AChE.

Other groups than the control group showed significant increase in the amounts of protein. In all groups except the control group, the 2,4-D's (0.05 ppm, 0.1 ppm, 0.2 ppm) in the control group increased AChE activity was observed.

SEMBOLLER

°C : Derece Celcius

g : Gram

mg : Miligram

µg : Mikrogram

l : Litre

ml : Mililitre

µl : Mikrolitre

nm : Nanometre

ppm : mg/l

KISALTMALAR

AChE	: Asetikolinesteraz Enzimi
AB	: Avrupa Birliği
DTNB	: Ellman Reaktifi (5-5'- Ditiyobis-(2-Nitrobenzoik Asit))
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetikasit
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GSH-Rd	: Glutasyon Redüktaz
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksiasetik asit

ŞEKİL LİSTESİ/LIST OF FIGURES

	SAYFA
Şekil 2.1. : Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması	21
Şekil 2.2. : 2,4-Diklorofenoksiasetik asit	25
Şekil 2.3. : Balık Solungaçlarının Genel Yapısı	29
Şekil 2.4. : Solungaçlardan Amonyak Atılımı	30
Şekil 2.5. : Balıklarda İyon Değişimi Mekanizması	31
Şekil 2.6. : Genel Akvaryum Görünümü	37
Şekil 2.7. : Balıkların Solungaçlarının Alınması	37
Şekil 2.8. : Solungaçlar ve Karaciğerler Steril Ependorf Tüplere Konur	38
Şekil 2.9. : Doku Dismembratörde Parçalanır	38
Şekil 2.10.: Örneklerin Santrifüj Edilmesi	39
Şekil 2.11. : Örneklerden Süpernatant Elde	40
Şekil 2.12. : Hazırlanan Çözeltiler Vortekslenir	41
Şekil 2.13. : Örneklerin Su Banyosunda İnkübasyonu	44
Şekil 2.14. : Örneklerin Santrifüj Edilmesi	44
Şekil 2.15. : Örneklerin Spektrofotometrede Ölçümlerinin Yapılması	45
Şekil 3.1: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında Protein Miktarları	47
Şekil 3.2: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Karaciğerlerinde Protein Miktarları	48
Şekil 3.3: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde Protein Miktarları	49
Şekil 3.4: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında AChE Miktarları	50
Şekil 3.5: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında AChE Spesifik Aktivitesi	51
Şekil 3.6: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında Kontrole Göre AChE Miktarları	52
Şekil 3.7: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Karaciğerlerinde AChE Miktarları	53

Şekil 3.8: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında AChE Spesifik Aktivitesi	54
Şekil 3.9: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Karaciğerlerinde Kontrole Göre AChE Miktarları	55
Şekil 3.10: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde AChE Miktarları	56
Şekil 3.11: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde <i>X. hellerii</i> Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde AChE Spesifik Aktivitesi	57

TABLO LİSTESİ

	SAYFA
Tablo 2.1. 2,4-D'nin Özellikler	25
Tablo 2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	34
Tablo 2.3. Kullanılan Cihazlar ve Marka İsimleri	35
Tablo:2.4. Deney Grupları ve Uygulanan Kimyasalların Dozları	36

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Giderek artan çeşitlilikte endüstriyel ve tarımsal kimyasalların alıcı ortamlara salınımı ile omurgalı ve omurgasız birçok organizma bu bileşiklerin etkisinde kalmaktadır. Doğal çevreyi kirleten toksik maddelerin başında pestisitler, deterjanlar ve ağır metaller gelmektedir. Deniz, göl ve akarsular gibi su kaynaklarının atıklar için alıcı ortam olarak kullanılması sonucu, derişimleri sürekli artan tarımsal kimyasallardan olan pestisitler sucul organizmalar tarafından bünyelerine alınmaktadır.

Her geçen gün tarıma elverişli alanlar giderek azalmaktadır. Bu yüzden birim alandan gelecek ürün miktarının artırılması gerekmektedir. Bu yöntemlerden biri de herbisitler ile yapılan kimyasal mücadele yöntemidir. Ancak, bu tarım ilaçlarının bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu çevrede oluşturduğu olumsuz etkiler günümüzün önemli sorunlarından biridir.

Balıklar çevresel kirliliğin izlenmesinde uygun indikatörlerdir. Çünkü hem beslenme yoluyla hem de direkt olarak sudan kirleticileri alarak dokularında yoğunlaştırırlar. Böylece besin zinciri yoluyla kirliliğin taşınmasına neden olurlar [1,2].

Zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan herbisitlerden biri de 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit herbisittir). 2,4 diklorofenoksiasetik asit ve diğer insektisit türevleri balıklar için oldukça toksik olup, düşük sıcaklıklarda daha zehirlidir.

2,4-D yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir Bundan dolayı soğuk su balıklarında, sıcak su balıklarından daha etkilidir. Asetilkolin büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir [3]. Asetilkolinesteraz enzimi başlıca beyinde, sinir hücrelerinde, kasta ve eritrositlerde bulunur. Enzim çeşitli hayvan türlerinde de yaygındır.

Proteinler yaşamsal öneme sahip hayvan ve insan hücrelerinde en bol bulunan organik bileşikleridir. Bütün biyolojik olaylarda hayati görevleri vardır. Bunlar farklı birçok biyolojik fonksiyonu yerine getirirler. Bunlardan biride enzimatik katalizlemedir.

Katalitik RNA moleküllerinin bir gurubu hariç bütün enzimler protein yapısındadır. Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların hemen hemen tamamı enzim adı verilen spesifik makromoleküller tarafından katalizlenmektedir.

Enzimlerin olağanüstü bir katalizleme gücü vardır. Örneğin 1 dakikada 36 milyon molekülü değişikliğe uğratan enzimlerde bulunmaktadır. Enzimler substratlarına karşı oldukça özgül davranmakta ve bir molekülün ancak belli bir kısmına etki etmekte ve bu bölgeden bir veya birkaç atomu veya fonksiyonel gurubu almakta veya ilave etmektedir. Böylece canlı sistemlerdeki kimyasal dönüşümlerin tamamına yakını enzimlerce gerçekleştirilmektedir.

Canlı sistemlerde tepkimelerin enzimatik katalizleri şarttır. Biyolojik olarak uygun koşullarda, katalizlenmeyen tepkimeler yavaş gerçekleşme eğilimindedir. Pek çok biyolojik molekül nötral pH, orta derecede sıcaklık ve hücre içi sıvı ortamında çok kararlıdır.

Ayrıca biyokimyadaki birçok yaygın tepkime, tepkime için gerekli olan belli yönelimdeki iki veya daha çok molekülün çarpışması veya kararlı olmayan yüklü araçların geçici oluşumu gibi hücre ortamında olanaksız veya tercih edilmeyen kimyasal olayları gerektirir.

Yiyeceklerin sindirimi, sinir uyarılarının gönderilmesi veya kas kasılması için gerekli tepkimeler kataliz olmazsa yararlı bir oranda oluşmazlar. Bir enzim bu problemleri belli bir tepkimeyi enerjetik olarak daha tercih edildiği özgül bir ortam sağlayarak ortadan kaldırır.

Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayırıcı özelliği; aktif yer olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Aktif yere bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur.

İlk olarak 1880’de Adolphe Wurtz tarafından varlığı gösterilmiş olan enzim-substrat kompleksi; enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar. E-S kompleksi, aynı zamanda enzim mekanizmalarının teorik tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışını açıklayan matematiksel işlemler için başlama noktasıdır (Nelson ve Cox, 2005).

Enzimler canlı hücreler tarafından biyolojik koşullarda sentez edilmektedir. Fakat aktivite göstermesi için mutlaka hücre içinde bulunmaları gerekmez. Hücre dışında da optimum şartları sağlanırsa aktivite gösterirler. Bugün enzimler hücreden çıkmış ve çeşitli bakımdan günlük ve ekonomik hayata girmiştir. Günümüzde ekmek, bira ve peynir üretimi gibi ekonomik sahalarda, temizlik alanları gibi günlük hayatta ve bir sağlık alanı olan tıpta teşhis ve tedavide enzimler büyük rol oynamaktadırlar.

Enzimler yalnız tıpta değil diğer birçok alanda da önem kazanmıştır. Bugün enzimlerin kimya sanayinde, ilaç sanayinde, gıda prosesinde, ziraatte ve hatta biyolojik savaşta pek çok kullanım alanı bulunmaktadır. Enzimler her biyokimyasal süreçte merkez durumundadır.

Enzimler düzenli tepkime dizilerindeki aktiviteleriyle besinsel moleküllerin parçalandığı tepkime basamaklarının yüzlercesini katalizler. Böylece kimyasal enerji korunur, dönüştürülür ve basit öncüllerden biyolojik makromoleküller üretilir.

Enzim çalışması oldukça pratik öneme sahiptir bazı hastalıklarda özellikle kalıtsal genetik bozukluklarda bir ya da daha fazla enzimin eksikliği veya tamamen yokluğu söz konusu olabilir. Diğer bir grup hastalığa da enzimin aşırı aktivitesi neden olabilir. Enzim aktivitelerinin kan plazmasında, eritrositlerde veya doku örneklerinde ölçümü belli hastalıkların tanısında önemlidir. Birçok ilaç tasarımı bu ilaçların biyolojik etkilerinin enzimlerle ilişkisi göz önüne alınarak yapılmaktadır.

I.2 AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, öldürücü olmayan dozlarda uygulanan 2,4-diklorofenoksiasetik asitin (zirai mücadelede kullanılan insektisit) Kılıçkuyruk (*Xiphophorus hellerii*) balıklarının solungaç ve karaciğer dokularının Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi üzerine etkilerini incelemektir.

Kontrol grubu dışında balıklar 96 saat süresince 2,4-diklorofenoksiasetik asitin LC50 değerinin %80'inin etkisine bırakılması planlanmaktadır. 2,4-diklorofenoksiasetik asitin toksik potansiyelini belirlemek amacıyla solungaç ve karaciğerinde AChE enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

Son zamanlarda, özellikle bilim ve teknoloji'de yaşanan gelişmeler toksisite olarak adlandırdığımız ve kimyasalların organizmada oluşturduğu hasarın belirlenmesi ve hasarlanma mekanizmalarının hüresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılmasında bilim adamlarına yardımcı olmuştur.

Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi ve solunum gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarlar. 2,4-D yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir ve bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engeller. Ancak, bunu yaparken seçici olarak sadece geniş yapraklı yabancı otları elimine eder.

Bu özelliklerinden dolayı tarımda birim alandan alınan verimin artırılması amacıyla piyasaya sunulan herbisitler bilinçsiz ve kontrolsüz kullanıldığında akut ve kronik zehirlenme, biyolojik dengenin bozulması, çevre ve besin kirlenmesi, insanlara ve hayvan türlerine yönelik teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi birçok açıdan evrensel nitelikli çevre sorunlarına sebep olmaktadır.

Tüm bunlardan dolayı bu çalışmamda ki amaç; zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin oral kullanımının kılıç kuyruğu balığına etki oluşturduğu histopatolojik etkilerini incelemektir.

Çalışmamızda enzim kaynağı olarak Kılıçkuyruk balığının (*X. Hellerii*) solungaç ve karaciğer organları seçilmiştir. Bir grup araştırmacı bir balık çeşidinin değişik dokularındaki asetilkolinesteraz enzimi üzerine organofosforlu pestisitlerin etkilerini araştırmışlardır. Yapılan bir araştırmada, iki Meksika lagününde yaşayan Nil Tilapyası (*Oreochromis niloticus*) türü balığın beyin AchE enzim aktivitesi üzerine metilparathionun mevsimsel etkisini araştırılmıştır. Söz edilen çalışmada kolinesteraz inhibisyonu, organofosfataz pestisitlerini belirlemede ve anlamada spesifik bir biyomarkır olarak kullanılmıştır. Bu in vitro teknik, sediment toksik testlerinde kirletici maddeyi denetlemek için önemli bir yöntem olarak da önerilmiştir.

Parkins ve arkadaşları 2000 yılında Karbamatlı pestisitlerden Aldicarb, Aldicarb sulfokside ve Aldicarb sulfan'ın kanal kedi balığı asetilkolinesterazı üzerine akut toksik etkisini araştırmışlardır. Ancak yapılan çalışmada kanal kedi balığının bu pestisitlere gökkuşağı alabalığı ve büyük güneş balığından akut toksik etkisine daha az hassas olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada, kanal balığında Aldicarb'ın in vivo metabolizması, plazma kinetikleri, toksik etkisi ile AChE inhibisyonu incelenmiştir. Genç balıklarda LC50 9,7 mg.L-1 olarak belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada farklı bir Çin balığının farklı dokularındaki AChE aktiviteleri ölçülmüştür. Bu balıklar bazı organofosfatlı pestisitlere maruz kalmış balıklardır. Çalışmada 3 farklı organofosfatlı pestisit kullanılmıştır. Çevresel kirleticilerin etkilerinin sucül ortamlardaki sonuçlarının ortaya konulması toksikolojik çalışmalar için önem taşımaktadır.

Organizmalar değişen koşullara karşı hücresel homeostazisi korumak durumundadır. Su ortamında pestisit ve ağır metallere akut ve kronik olarak etkilenen en önde gelen canlı grubu balıklardır. Solungaçlar, balığın dış yüzey alanının en geniş kısmıdır. Solungaçların dış çevre ile sürekli teması solungaçları sudaki kirleticilere karşı ilk hedef yapar. Bu nedenle, kirleticilerin sebep olduğu solungaçlardaki fonksiyonel bozukluklar, balığın sağlığına önemli bir şekilde zarar verebilir. Buna ilaveten balık solungaçları, su kirlilik seviyelerinin en uygun indikatörleri olarak düşünülmektedir.

Balık, insan için önemli bir besin olup balığın kronik olarak kirleticilerden(kimyasallardan) etkilenmesi, dokularında pestisit ve ağır metalleri kronik olarak biriktirmesi balığı tüketen insanların sağlığını da ciddi olarak etkilemektedir. İn

vitro ve in vivo çalışmalarda bu kirleticilerin toksik etkilerinin araştırılması çevre kirliliğinin toksikolojik değerlendirilmesi açısından çok önemlidir.

Zirai mücadelede kullanılan herbisitlerin su canlılarına yönelik toksisitesi, oldukça farklı bir durum göstermektedir. Genellikle, bu gruptan herbisitlerin etkilerinin artışına paralel bir şekilde balıklara yönelik toksisitelerinin de yükseldiği gözlenmektedir. Belirtilen durum, özellikle de zirai mücadele amacıyla yaygın bir şekilde doğrudan iç sulara bulaşabilen ışığa dayanıklı herbisitlerde daha da belirginleşmektedir.

Herbisitler, biyotransformasyon hızlarının yavaş ve vücutlarındaki yarı ömürlerinin uzun olması (genellikle 48 saat) nedeniyle su ürünleri ve arılar için oldukça zehirli maddelerdir. Sularda bulunan sentetik herbisitler lipofilik (yağı seven) özelliklerinden dolayı, balık solungaçlarından emilerek kana geçerler. Böylece, büyük ölçüde metabolik değişikliklerden kurtulan bileşikler su canlılarında damar içi verilmelerine eşdeğer derecede toksik etki yapabilir.

Belirtilen nedenlerle, doğal sulara karışan 0.001-0.0001 mg/L yoğunluklarındaki herbisitler su canlıları için öldürücü olabilmektedir. Bu durumda sentetik herbisitlerin organik klorlu herbisitlerden 100 kat daha fazla toksik etkinliğe sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Özellikle 2,4-diklorofenoksiasetik asit 50 yıldır ülkemizde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ben bu çalışmamda tarımsal alanlarda yoğun olarak kullanılarak sucul ortama toksik kirletici olarak bulaşan 2,4 - diklorofenoksiasetik asitin su canlılarına nasıl etki ettiğini gözlemlemek incelemek ve biyotoksik araştırmalarla ilgili olarak önemli bir boşluğu kapatmayı amaçladım. Çünkü su canlıları özellikle balıklar insan için önemli bir besin olduğu için balığın kronik olarak etkilenmesi, dokularında pestisit ve ağır metalleri akut olarak biriktirmesi balığı tüketen insanların sağlığını da ciddi olarak etkilemektedir.

1.3 LİTERATÜR ÖZELLİKLERİ

Su kirliliğini oluşturan unsurlardan biri olan pestisitler, bitki hastalıkları, zararlı böcekler ve yabancı otlar gibi tarımsal ürünlerin azalmasına sebep olabilecek çeşitli etmenlere karşı kullanılan kimyasal bileşiklerin hepsine birden verilen genel bir isimdir. Ya da besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında besin değerini bozan ve bitkilere zarar veren böcekleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları yok etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir.

Tarımsal ve diğer zararlılarla mücadelede, büyük rol oynayan tarımsal mücadele ilaçları pestisitler, istenmeyen bazı yan etkilere de yol açmıştır. Bilinçsizce yapılan pestisit uygulamaları insan, hayvan ve çevre sağlığını tehdit etmektedir (Yıldırım, 2000).

Pestisitler, doğrudan suya yapılan uygulamayla (sivrisinek mücadelesinde, suda yaşayan bitkilere karşı, vb), imalat artıklarının deşarjıyla, tarımdaki uygulamasını takiben drenaj sularına, yüzey akışı, yağmur suyu ve sulama sularına karışarak, boş pestisit ambalajlarının akarsu, göl ve denizlere atılmasıyla, atmosferik olaylarla su ortamına ulaşmakla ve yerleşim bölgelerinde insektisit olarak kullanımla, kanalizasyona karışma ile geniş bir alandaki sulara yayılırlar (Egemen ve Canyurt, 1996; Güler ve Çobanoğlu, 1997; Atamanalp ve Yanık, 2001).

Pestisitlerin su içerisindeki hareketliliği kısmen suda eriyebilirlik ve formülasyonuna bağlıdır. Suda eriyebilen veya suda eriyebilecek şekilde formüle edilen pestisitler su içerisinde dağılarak, parçalanma özelliklerine bağlı olarak fotoliz ve hidroliz olurlar. Ancak toz veya granül formda bulunanlar su içerisinde askıda kalarak uzun süre aktif maddelerin yayılmasına neden olurlar. Balık ve diğer sucul canlılar, pestisitleri solunum, beslenme, ve deriden bünyelerine alırlar (Atamanalp ve Yanık, 2001).

Pestisitlerin türüne ve etki mekanizmalarına bağlı olarak organizmalar üzerinde akut ve kronik etkiler ortaya çıkar. Akut etkiler kısa sürede kendisini, maruz kalan canlının ölümüyle gösterir. Kronik etkiler ise kirleticiye maruz kalan canlının daha uzun sürede farklı etkilerle karşı karşıya kalmasına sebep olur. Kronik maruz kalma sonunda pek çok metabolik faaliyet bozulur. Kronik etkiler arasında, canlının büyümesinde gerileme, fizyolojik, biyokimyasal sorunlar, üreme bozuklukları ve anormal yeni nesillerin ortaya çıkması sayılabilir.

Pestisitlerin etkilerinin belirlenmesinde akut etkiler yeterli olmayabilir hatta çok defa yanıltıcı da olabilir. Bu yüzden pestisitlerin kronik etkilerinin araştırılması ve elde edilen bilgilere göre kararlar verilmesi, tedbirler alınması gerekmektedir. Kronik etkiler ortaya konulduktan sonra pestisitlerin kullanımı, üretimi sınırlandırılabilir (Lloyd, 1992; Egemen ve Canyurt, 1996; Çetinkaya, 2005).

Su ortamında pestisitlerden akut ve kronik olarak etkilenen en önde gelen canlı grubu balıklardır. Pestisitler, balık populasyonlarının zayıflamasına, ticari değerlerinin düşmesine, populasyonun zamanla yok olmasına neden olmaktadır. Balık, insan için önemli bir besin olduğu için balığın kronik olarak etkilenmesi, mesela dokularında pestisiti kronik olarak biriktirmesi balığı tüketen insanların sağlığını da ciddi olarak etkilemektedir (Egemen ve Canyurt, 1996; Atamanalp ve Yanık, 2001).

Sucul organizmalara ve özellikle de balıklara yönelik toksisite ve tolerans testlerinin yapılmasındaki temel amaç; bir toksik maddenin hangi konsantrasyonlarda organizmaya zararlı, hangi seviyelerde görünür bir etki yapmadığının belirlenmesidir. Elde edilen sonuçlarla, ilgili su kaynağındaki organizmanın sağlıklı olarak yaşayıp üreyebilmesi için gerekli maksimum konsantrasyonlar belirlenerek, yapılmış olan fizikokimyasal analiz sonuçlarını yorumlamaya ve değerlendirmeye yönelik bilgileri ilgili yerlere sunmaktır. Yapılan testlerle bulunan değerler, o tür için su kalitesi standartlarının ortaya konulmasında kullanılır (Sprague, 1990).

Edwards ve Tchounwou (2005), metil parathion'ın tarımsal bir insektisit olarak geniş bir alanda kullanılan, sertifikalı kullanıcılar tarafından veya bu kullanıcıların danışmanlığı ile kullanılan bir insektisit olduğunu, metil parathion'ın organik fosfor (OP)'lu kimyasalların sınıflandırmasına uygun olarak asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini engelleme kabiliyeti ile karakterize edildiğini ifade etmişlerdir.

1930'larda ortaya çıkan OP'lilerin, kimyasal savaş ajanları gibi tarihi olarak kullanılan pestisit bileşiklerinin bir grubu olduğunu ve bu bileşiklerin, maruz kalan organizmaların sinir sistemi üzerinde derin bir etkiye sahip AChE inhibisyonunu geri alınamaz şekilde etkiye sahip olduklarını, yağda çözündüklerini rapor etmişlerdir. Fosfor içeren insektisitler olan OP'lilerin insektisit özelliklerinin ilk olarak, Almanya'da 2. Dünya savaşı boyunca aşırı toksik OP'li bileşiklerden sarin (2-(floro-metil-fosforil) oksipropan), soman (3-(floro-metil- fosforil) oksi-2,2-dimetil-bütan) ve tabun (etil N,N dimetil fosforamidosiyanidat) sinir gazları çalışmalarında gözlemlendiğini, bu kimyasal grubunun malathion, diazinon, chlorpyrifos, azamethiphos, dichlorvos, parathion gibi insektisitleri içine aldığını ifade etmişlerdir.(2011)

Asetilkolinesteraz enzimi ilk defa 1938 yılında elektrik balığının (*Torpedo marmorata*) elektrik organından ekstraksiyon yoluyla saflaştırılan bu enzim diğer esterazlardan asetilkolini hidrolize etmesi özelliğinden dolayı kolaylıkla ayırt edilmektedir. Bu nedenle asetilkolinesteraz olarak adlandırılır. Birçok dokuda farklı tipleri bulunmaktadır (Nachmansohn ve Lededer, 1939).

Tip I kolinesteraz olan hakiki kolinesteraz, sinir dokusunda bulunur. Serumda ve kırmızı kan hücrelerindeki tip II kolinesteraz (Pseudokolinesteraz) yanında hakiki kolinesteraz da vardır (Nachmansohn ve Lededer 1939, Nachmansohn ve Rothenberg 1944a, Nachmansohn ve Rothenberg 1944).

Wheelock ve ark. (2005), AChE aktivitesinin OP'li ve karbamatlı pestisitlere maruz kalmanın bir biyobelirteci olarak izlenmesinin gelenekselleştiğini, AChE aktivitesinin bu agrokimyasallar için çok duyarlı bitim noktası olmayabileceğini, OP'lilerin AChE aktivitesini etkilemeyen konsantrasyonlarda ters fizyolojik etkilere sebep olabileceğini rapor etmişlerdir. Enzim ailesiyle ilişkili olan karboksilesterazın bazı OP'liler ve karbamatlılar için AChE'den daha yüksek afiniteye sahip olduğunu ve bu pestisitlere maruz kalmış çevrenin çok duyarlı indikatörü olabileceğini bildirmişlerdir. Jüvenil *Oncorhynchus tshawytscha* balıklarının OP'li chlorpyrifosa maruz bırakarak karboksilesteraz ve AChE aktivitelerini ölçmüşlerdir.

Chlorpyrifosun yüksek dozunda (7.3 µg/L) AChE inhibisyonu beyin (% 85) ve kas (% 92) dokusunda önemli bulunduğunu, düşük dozda (1.2 µg/L) ise önemsiz olduğunu tespit etmişlerdir (Chang ve ark. 2006) .

Tatlısu Karidesi *Macrobrachium rosenbergii*'yi trichlorfonun 0, 0.2, 0.4 mg/l konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz bırakarak toksisitesini belirlemeye çalışmışlar, AChE aktivitesini ölçmüşlerdir. Buna göre; 24, 48, 72 ve 96 saat LC50 değerini sırasıyla 0.7739, 0.3513, 0.2697 ve 0.2555 mg/L olarak belirlemişlerdir. 0.4 mg/L trichlorfon grubunda hemolenf ve hepatopankreasın AChE aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir. *Macrobrachium rosenbergii* solungaçlarında hemoselik boşlukta hemositik infiltrasyon, lamellanın şiştiğini, eridiğini ve nekrotik, hiperplastik ve ucu kalınlaşmış lamellaların olduğunu gözlemlemişlerdir (John 2007).

1996 yılında Türkoğlu sığır serum ve eritrositlerinden asetilkolinesterazı afinite kromatografisiyle saflaştırmış ve bu saf enzim üzerine bazı pestisitlerin etkilerini araştırmıştır. Çalışmada sepharose-4B-EDCI kolonu kullanılarak sığır serum ve eritrositlerinden asetilkolinesteraz saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzimin saflığı kontrol edildikten sonra, 8 ayı pestisidin etkisi araştırılmıştır. Enzim saflaştırma oranı sığır serumu için 4301 kat, sığır eritrositi için 4367 kat olarak bulunmuştur. Kullanılan her bir pestisidin K_i ve I_{50} değerleri tespit edilmiştir (Türkoğlu, 1996).

2000 yılında Alırız ve Türkoğlu Van Gölü balığında (*Chalcalburnus Tarichi*) asetilkolinesteraz enzimini saflaştırmışlar ve kinetik özelliklerini araştırmışlardır. Van Gölü Balığı (*Chalcalburnus tarichi*) plazma ve eritrositlerinden asetilkolinesteraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılması incelenmiştir. SDS-PAGE elektroforezi ile enzim saflığı kontrol edilmiştir. Saflaştırma oranları plazma AChE için 3251.6, eritrosit AChE için ise 8500 olarak bulunmuştur (Alırız ve Türkoğlu, 2000).

Orhan ve arkadaşları tarafından 2004 yılında 21 çeşit tıbbi bitkinin kloroform: metanol (1:1) ekstraktlarının hem asetilkolinesteraz hemde bütirikolinesteraz enzimleri üzerine inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bu in vitro çalışmada bitkilerden bazılarının % inhibisyon oranlarını önemli ölçüde değiştirdiği görülmüştür. Özellikle Ericaceae familyasındaki bazı bitkilerin asetilkolinesterazı, Fumariaceae ve Caeselpiniaceae familyasındaki bazı bitkilerin ise bütirikolinesterazı kuvvetle inhibe ettikleri anlaşılmıştır (Orhan ve ark., 2004).

Rodriguez-Fuentes ve arkadaşları iki Meksika lagününde yaşayan Nil Tilapyası (*O.niloticus*) türü balığın beyin AChE si üzerine metilparathionun mevsimsel etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada kolinesteraz inhibisyonu, organofosfataz pestisitlerini

belirlemede spesifik bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Bu in vitro teknik, sediment toksik testlerinde kirletici maddeyi denetlemek için önemli bir yöntem olarak da önerilmiştir (Rodriguez-Fuentes ve ark., 2000).

Keane ve arkadaşları *Galleria mellonella*'den izole edilen asetilkolinesteraz enzimi üzerine bazı monoterpenlerin etkilerini araştırmışlardır. *Galleria mellonella*'nin beyninden önce afinite kromatografisi, daha sonra iyon değişim kromatografisi kullanılarak asetilkolinesteraz enzimi saflaştırılmış ve saflığı SDS-PAGE jel elektroforeziyle kontrol edilmiş ve sonuçta 283 kat saflaştırıldığı bulunmuştur. Beş monoterpenin bu enzim üzerine etkileri araştırılmış ve K_i değerleri bulunmuştur (Keane ve ark., 1999).

Karbamatlı pestisitlerden Aldicarb, Aldicarb sulfoksit ve Aldicarb sulfan'ın kanal kedi balığı (*Pterygoplichthys multiradiatus*) asetilkolinesterazı üzerine akut toksik etkisini Parkins ve arkadaşları 2000 yılında çalışmışlardır. Ancak yapılan çalışmada kanal kedi balığının bu pestisitlere gökkuşacağı alabalığı ve büyük güneş balığından akut toksik etkisine daha az hassas olduğu anlaşılmıştır. Kanal balığında (*Pterygoplichthys multiradiatus*) Aldicarb'ın in vivo metabolizması, plazma kinetikleri, toksik etkisi ile AChE inhibisyonu incelenmiştir. Genç balıklarda LC_{50} 9,7 mg.L-1 olarak belirlenmiştir (Parkins ve ark., 2000).

Benzer bir çalışmada da Çin balığının (*Myxocyprinus asiaticus*) farklı dokularındaki AChE aktiviteleri ölçülmüştür. Bu balıklar bazı organofosfatlı pestisitlere maruz kalmış balıklardır. Çalışmada 3 farklı organofosfatlı pestisit kullanılmıştır. Rahman ve arkadaşları tarafından 2004 yılında yapılan bu çalışmada IC_{50} değerlerinin yanında enzimin V_{max} ve K_m sabitleri de bulunmuştur (Rahman ve ark., 2004).

2003 yılında Rhee ve arkadaşları bazı bitki ekstraktlarının asetilkolinesteraz enzimi üzerine etkisini hızlı ölçüm metodunu kullanarak tayin etmişlerdir. Çalışmada rastgele seçilen 29 bitkinin % 30' luk metanol ekstraktları kullanılmıştır. Bunlardan dördü kuvvetli inhibisyon etkisi gösterirken diğerlerinin zayıf inhibisyon etkisi gösterdiği bulunmuştur. Bitkilerin soğanları, kökleri ve ufak kök bölümleri rastgele seçilerek ekstrakte edilmiştir (Rhee ve ark., 2003).

Yılan Balığı'nda (*Anguilla anguilla*) 96 saat süre ile 0.22 ppm thiobencarb etkisinde göz dokusunda spesifik AChE aktivitesinin %75 oranında azaldığı, maksimum azalmanın 12. saatte meydana geldiği saptanmıştır (Sancho ve ark., 2000). Yılan Balığı'nda (*A. anguilla*) 96 saat süre ile 0.22 ppm thiobencarb etkisinde beyin dokusunda AChE aktivitesinin 2. saatten itibaren azaldığı, toplamda %20 inhibisyon meydana geldiği bildirilmiştir. Depurasyon süresince AChE aktivitesinde inhibisyon gözlenmemiş tam aksine enzim aktivitesinde artma meydana gelmiştir (Fernández-Vega ve ark., 2002).

Sazan balığı'nda (*Labeo rohita*) 15, 30 ve 45 gün süre ile cypermethrin uygulamasının beyin dokusunda AChE aktivitesini 45. günde önemli derecede azalttığı saptanmıştır (Das ve Mukherjee, 2003).

Güneş balığı'ta (*Lepomis macrochirus*) beyin dokusunda 1.0 µg/L endosülfan etkisinde AChE aktivitesinin önemli derecede azaldığı gösterilmiştir (Dutta ve Arends, 2003).

Nil Tilapyası'ta (*O. niloticus*) 1, 7 ve 15 gün süre ile 0.27, 0.54, 0.81 ve 1.35 ppm etoxazole uygulamasının karaciğer dokusunda, AChE aktivitesi ile malondialdehit miktarına etkileri araştırılmıştır. AChE aktivitesinde inhibisyon gözlenmiştir. Malondialdehit miktarında 1. ve 15. günlerde değişim olmazken 7. günde artış meydana gelmiştir (Oruç ve ark., 2004).

Chlorpyrifos ve carbosulfan etkisinde *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda kolinesteraz aktivitesinin beyin dokusuna oranla daha yüksek olduğu ve chlorpyrifos'un daha toksik olduğu bildirmiştir (Chandrasekera ve Pathiratne, 2005).

Mikrositinler, 80 çeşidiyle siyonobakteriyel toksinlerin çeşidi olarak kabul edilir. Bu toksinler bazı organizmalarda genellikle protein fosfat üretimini ve oksidatif stres yaratılmasını engellemektedir. Daha önceki çalışmaların da gösterdiği gibi bu mikrositler hem beyinde toplanmakta hemde balık türlerinin davranışlarını etkilemektedirler. Bu çalışmada da zebra balıklarında in vitro ve in vivo etkiler incelenmiştir. Farklı konsantrasyondaki AChE aktivitesi test edilmiştir. İn vivo çalışmalarda 100 µg/L miktarında ki mikrositler, zebra balığı suda çözünen bir toksin salgıladığında AChE aktivitesinde önemli bir artış meydana getirmektedir. İntraperitoneal, enjekte edildiğinde ise önemli bir değişim olmamaktadır.

Bunun yanı sıra zebra balığının beyinde AChE aktivasyonu, nörotoksik bileşiklerin ortaya çıkmasını sağlamaktadır. Mesela, AChE fare eritrositlerinde ve zebra balığının farklı bölgelerinde protein aktivitesini düzenlemektedir. Buna ilave olarak akut etanolun ortama karışmasından sonra zebra balığının beyinde AChE aktivitesinde önemli bir artış olmamaktadır. (L. Kist 2012).

Gökkuşluğu balıkları kimyasal kirlenmeye maruz kaldıklarında bağışıklık sistemleri etkilenmektedir. Bir başka çalışmada da gökkuşluğu balıklarında ortamda ki herbisit varlığından dolayı meydana gelen AChE aktivitesinde görülen değişimler araştırılmıştır. Bu çalışmada gökkuşluğu balıklarında, herbisitlerin aktif maddesi olan pendimetalinin in vivo etkileri araştırılmıştır. Araştırmada onar tane balıktan oluşan toplam üç grup oluşturulmuştur. Önce balıklara on beş gün madde konmamış akvaryumlarda ortama alıştırılmıştır. Daha sonra yirmi sekiz gün boyunca farklı konsantrasyonlarda pendimetalin verilmiştir. (Birinci gruba 100 µg/L, ikinci gruba 200 µg/L, üçüncü gruba 300 µg/L olmak üzere.). Daha sonra akyuvar hücre sayımı, diferansiyel lökosit sayımı, hücre ölüm oranı ve fagositoz aktivitesi ölçülmüştür. Bunun sonucunda, alternatif tamamlayıcı olan hemotolik aktivitesi, lizozom konsantrasyonu ve stres parametresi analiz edilmiştir. Pendimetalinin konsantrasyonu arttıkça buna doğru orantılı olarak balıklarda meydana gelen bağışıklık sisteminde ki düşüşlerde artmıştır. Sonuç olarak balıkların yaşam ortamı olan akvaryuma eklenen pendimetalinin konsantrasyonu AChE aktivitesini daha önceye göre düşürmüştür (M. Darion 2012)

Zebra balıklarının beyin aktiviteleri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Çalışmada zebra balıklarına 500 µg/L insektisit verilmiştir. Zebra balıklarının beyin aktivitelerinde ki sinaptik uyarılarda aksamalar meydana gelmiştir. Akyuvar hücre sayımı, diferansiyel lökosit, lökosit sayımı, hücre ölüm oranı ve fagositoz aktivitesi ölçülmüştür. AChE yapısal olarak asetilkoline benzeyen organofosfor ve karbamat insektisitlerin başlıca hedefidir. İnsektisitlerin enzimlerle bağlanması üzerine, AChE aktif bölgelerde ki artıkların fosforlaşma ve karbomolasyonundan dolayı aktifliğini yitirmektedir. Bunun bir sonucu olarak sinaptik membranlarla depolarize olarak kalmasıyla sinaptik aktarımı gerçekleşmemektedir. (Rosemberg D.2012)

Dünya çapında kullanılan ilaçların çoğu zehirlidir, ve çevrede onlara uzun süre maruz kalan canlılar ciddi problemlerle karşı karşıya gelir. Mevcut ilaçların arasında

olan organofosfat ve karbamat (böcek öldürücü ilaçlar) zehirli bileşiklerin önemli bir sınıfını temsil eder. Onların zehirliliği, AChE eksikliğine neden olur. Organofosfat ve karbamat, organoklorlu insektisitler çevreye olumsuz etki eder. Bunların yoğun kullanımı yer suyunun kirlenmesine dolayısıyla yiyeceklerinde kirlenmesine sebep olur. (P. Raghu , T. Madhusudana 2012)

BÖLÜM 2

MATERYAL VE METOD

2.1. ENZİMLER VE ENZİMLERİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Enzimler, oldukça özellikli proteinlerdir. Enzimler substratları için yüksek özgüllüğe sahiptir, kimyasal tepkimeleri müthiş derecede hızlandırır ve pH ve sıcaklığın optimum koşulları altındaki sıvı çözeltilerde işlev görür.

Canlı sistemlerde tepkimelerin enzimatik katalizleri şarttır. Biyolojik olarak uygun koşullarda, katalizlenmeyen tepkimeler yavaş gerçekleşme eğilimindedir. Pek çok biyolojik molekül nötral pH, orta derecede sıcaklık ve hücre içi sıvı ortamında çok kararludur. Besinlerin sindirimi, sinir uyarılarının gönderilmesi veya kas kasılması gibi tepkimeler kataliz olmazsa yararlı bir oranda oluşmazlar. Bir enzim bu problemleri belli bir tepkimeyi enerjetik olarak daha tercih edildiği özgül bir ortam sağlayarak ortadan kaldırır.

Enzimle katalizlenen bir tepkimenin ayırıcı özelliği; aktif yer olarak adlandırılan enzim üzerindeki sınırlandırılmış bir bölgenin içinde meydana gelmesidir. Aktif yere bağlanan ve enzimin üzerinde aktivite gösterdiği molekül substrat olarak adlandırılır. Aktif bölge yüzeyi, yan grupları substrata bağlanan ve bunun kimyasal transformasyonunu katalizleyen amino asit kalıntılarıyla oluşturulmuştur.

İlk olarak 1880'de Adolphe Wurtz tarafından varlığı gösterilmiş olan enzim substrat kompleksi; enzim aktivitesinde merkezi bir rol oynar. E-S kompleksi, aynı zamanda enzim mekanizmalarının teorik tanımlanması ve enzimle katalizlenen tepkimelerin kinetik davranışını açıklayan matematiksel işlemler için başlama noktasıdır (Nelson ve Cox, 2005).

Yaşam, güçlü ve özgül katalizörler olan enzimlere bağlıdır. Hemen hemen bütün biyokimyasal tepkime bir enzim tarafından katalizlenir. Birkaç katalitik RNA hariç bütün bilinen enzimler, proteindir. Enzimler yaygın olarak enzimatik tepkime hızını 10^5 - 10^7 V_{max} arasında bir faktörle hızlandıran olağanüstü etkili katalizörlerdir.

Enzimlerin hem in vivo hem de in vitro aktivitelerinin bazı bileşikler tarafından azaltılması ve hatta yok edilmesi olayın inhibisyon, bu olaya sebep olan bileşiklere de inhibitör denilir. Enzimatik aktiviteyi kontrol eden bu küçük moleküller, biyolojik

sistemler üzerinde büyük ölçüde kontrol sağladıkları için çok önemlidirler. Bir çok ilaçlar ve toksik maddeler de enzim inhibitörü gibi davranırlar.

Enzimatik aktivitenin inhibisyonu, biyolojik sistemlerde başlı başına bir kontrol mekanizması oluşturduğundan önemli bir olaydır. Birçok ilaçlar ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla gösterir. İnhibitörler enzim etki mekanizmalarının, aydınlatılmasında biyokimyacılar için çok önemli bir araç fonksiyonunu görmüştür. Enzimatik inhibisyon dönüşümlü veya dönüşümsüz olabilir. Dönüşümsüz inhibitör enzime kovalent olarak bağlanır veya zor ayrışabilen bir kompleks oluşturur.

Dönüşümsüz inhibisyonun aksine dönüşümlü inhibisyonda, enzimle inhibitör etkileşmesi bir denge reaksiyonu şeklindedir. Dönüşümlü inhibisyonun en basit tipi yarışmalı (Kompetitif) olanıdır. Yarışmalı inhibitör, yapı itibarıyla substrata benzer ve enzimin aktif bölgesine bağlanır. Böylece substratın enzime bağlanması önlenmiş olur. Fakat substrat konsantrasyonunu artırmakla inhibitör etkisi kaldırılabilir.

Yani enzimin V_{max} değeri değişmez. Çünkü hem enzim-substrat, hemde enzim-inhibitör komplekslerinin ayrışmaları bir denge reaksiyonu olduğundan substrat konsantrasyonunun artırılması dengeyi ES kompleksi lehine kaydırır.

Yarışmalı inhibitörler sıklıkla substrata benzeyen ve bir enzim-inhibitör kompleksi oluşturmak için enzimle birleşen bileşiklerdir. Bu tipin hızla seyreden bileşimleri bile enzimi negatif etkileyecektir. Substrata benzeyen inhibitörlerin moleküler geometrisi dikkate alındığında biz normal substratın hangi kısmının enzime bağlandığı hakkında sonuca ulaşabiliriz.

Yine dönüşümlü bir tip olan yarışmasız (nonkompetitif) inhibisyonda inhibitör ve substrat enzim moleküllerine aynı anda bağlanabilir. Bu bağlanmanın enzimin aynı dört bölgesine olmadığını gösterir. Yarışmasız bir inhibitör etkisini bir enzimin turnover sayısını yani katalitik aktivitesini düşürerek gösterir. Burada substrat ve inhibitör arasında yarışma söz konusu değildir.

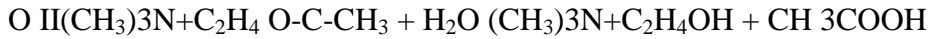
Bilindiği üzere metabolizmanın içerisinde yer alan birçok metabolik yolun düzenlenmesi yapılmaktadır. Metabolizma minimum enerji ve maksimum düzensizlik prensiplerine göre hareket eder. Metabolik yollar düzensiz bir şekilde işlemez. Bunlar çeşitli etkilerle kontrol altına alınırlar. Enzimlerde bu kontrol görevini üstlenen faktörlerden biridir. Enzimlerin aktiviteleri bazı bileşikler tarafından artırılarak,

azaltılarak ya da yok edilerek metabolik yolun hızı ayarlanmış olur. Burada etkili olanlar ara ürün ihtiyacı ve enerji ihtiyacıdır. Enzimlerin aktivitelerini etkileyen bu bileşiklere modülatörler denilmektedir. Modülatörler aktiviteyi artırıcı yönde olan aktivatörler olabildiği gibi aktiviteyi azaltıcı yönde olan inhibitörlerde olabilir.

2.1.1. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolin büyük biyolojik öneme sahip bir esterdir. Onun güçlü farmakolojik etkisi 1906 yılında bulunmuştur. Önceleri bazı farmakolog ve fizyologlar, bu esterin sadece sinir uçlarından etkilediği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine, sinir impulsu taşıma görevi olduğuna inanıyorlardı. Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu esterin sadece bu görevi yapmadığı ayrıca sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu bulundu.

Oldukça spesifik olan ve yalnızca asetilkolini hidroliz eden ester dış çevre ile lifin iç kısmı arasında konsantrasyon farklılıklarının oluşması neticesi sodyum iyonu geçişi ve bir elektrik akımının meydana gelmesine de sebep olmaktadır. Bu olayın sonunda ester, asetilkolinesteraz enzimi tarafından hidroliz edilerek inaktif hale getirilir. Hidroliz sonunda iki tane inaktif kısım meydana gelir. Bunlar, kolin ve asetik asittir.



Bir süre sonra inaktif formlar restore edilerek eski haline dönerler ve sonraki impulsu geçirmeye hazır hale gelirler. Enzimin bu etkisi iletimin esasını oluşturur. Asetilkolinesteraz enzimi başlıca beyinde, sinir hücrelerinde, kasta ve eritrositlerde bulunur.

Enzim hayvanlar aleminde de yaygındır. Örneğin tavuk beyininin 400-500 mg'ı milisaniyede 1014 molekül asetilkolini hidroliz edebilir. Elektrik balığının (*Torpedo vulgaris*) elektrik organı en zengin AChE kaynaklarından biridir. Kolinesteraz, ilk keşfedildiği yer olan insan serumunda bulunur.

Son yıllarda spesifik AChE, eritrositte bulunan AChE'den farklı olarak serum da bulundu. Serum ve eritrosit AChE'nin optimum pH'sı yaklaşık 7.2'dir. Bununla birlikte

her iki enzim de farklı optimum substrat konsantrasyonuna sahiptir. Serum AChE aktivitesinin ölçümü hastalıkların teşhisinde kullanılır. Çünkü normal değerler değişikliği çeşitli hastalıklara, örneğin; hepatitler, habis tümörlü hastalar, astım ve akciğer tüberkülozunda ortaya çıkar.

Uyarılmış bir nöron tarafından salınan asetilkolin sinaptik aralıktan veya nöromüsküler bileşmeden postsinaptik nöron veya kas hücrelerine doğru birkaç mikrometre ilerleyerek burada asetilkolin reseptörüyle etkileşir ve alıcı hücrenin elektriksel olarak uyarılmasını (depolarizasyonunu) tetikler.

Asetilkolin reseptörü allosterik bir protein olup, iki α altbirimi üzerinde, iyon kanısından yaklaşık 3.0 nm uzaklıkta iki yüksek ilgili asetilkolin bağlanma yeri içermektedir. Asetilkolin bağlanması iyon kanalında kapalıdan açığa doğru bir konformasyon değişikliğine neden olmaktadır. İşlem pozitif kooperatiftir: birinci yere asetilkolin bağlanması ikinci yerin asetilkolini bağlama ilgisini artırmaktadır.

Presinaptik hücreler kısa bir süre asetilkolin salgıladığı zaman, postsinaptik hücre reseptörünün her iki bölgesi de kısa süreli işgal edilir ve kanal açılır. Bu durumda Na^+ veya Ca^{+2} zardan geçebilir ve bu iyonların hücre içine akışıyla plazma zarı depolarize olarak, dokunun tipine göre değişiklik gösteren daha sonraki olayları başlatır. Nöromüsküler bileşkede ise kas lifinin depolarizasyonu kas kontraksiyonunu tetikler. Sinaptik yarıdaki asetilkolin derişimi normalde, yarıda bulunan asetilkolinesteraz enzimiyle hızla düşürülür.

Asetilkolin düzeyleri birkaç milisaniyeden fazla yüksek kalırsa, reseptör duyarsızlaştırılması ortaya çıkar. Reseptör kanalı, kapalı ve asetilkolinin çok sıkı bağlı olduğu üçüncü bir konformasyona dönüşür. Asetilkolinin bağlanma bölgelerinden yavaş serbestleşmesi, reseptörün kapalı ve asetilkolin düzeylerine yeniden duyarlı olduğu dinlenme durumuna gelmesine olanak sağlar.

2.2. PESTİSİTLER

Tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini artırmak için modern tarım tekniklerinin ve girdilerinin kullanılması gerekmektedir. Bitki koruma ürünleri içerisinde yer alan pestisit kullanımı da bu girdilerden biridir ve modern tarımın tamamlayıcı bir bileşenidir. Pestisit kullanımı, tarımsal ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararından koruyabilmek, kaliteli üretimi güvence altına alabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup, 1940 lı yıllardan beri üretimi arttıran en önemli bileşendir. Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir. Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, % 95'in üzerinde bir paya sahip olan kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde % 60' lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır.

Pestisit kullanımı her ne kadar tarımsal bir faaliyet olarak gözükmekte ise de yukarıda adı geçen IPM (Integrated Pest Management) ilkeleri gereği, pestisitlerin uygulama anında ve uygulamadan sonra akıbetleri birçok bilim disiplinlerini ilgilendirmektedir. Bunlar tarım, biyoloji, kimya, fizik, ekoloji, tıp, mühendislik, ticaret, ekonomi ve kalıntı analizlerinin güvenilirlik değerlendirmesi için istatistiktir.

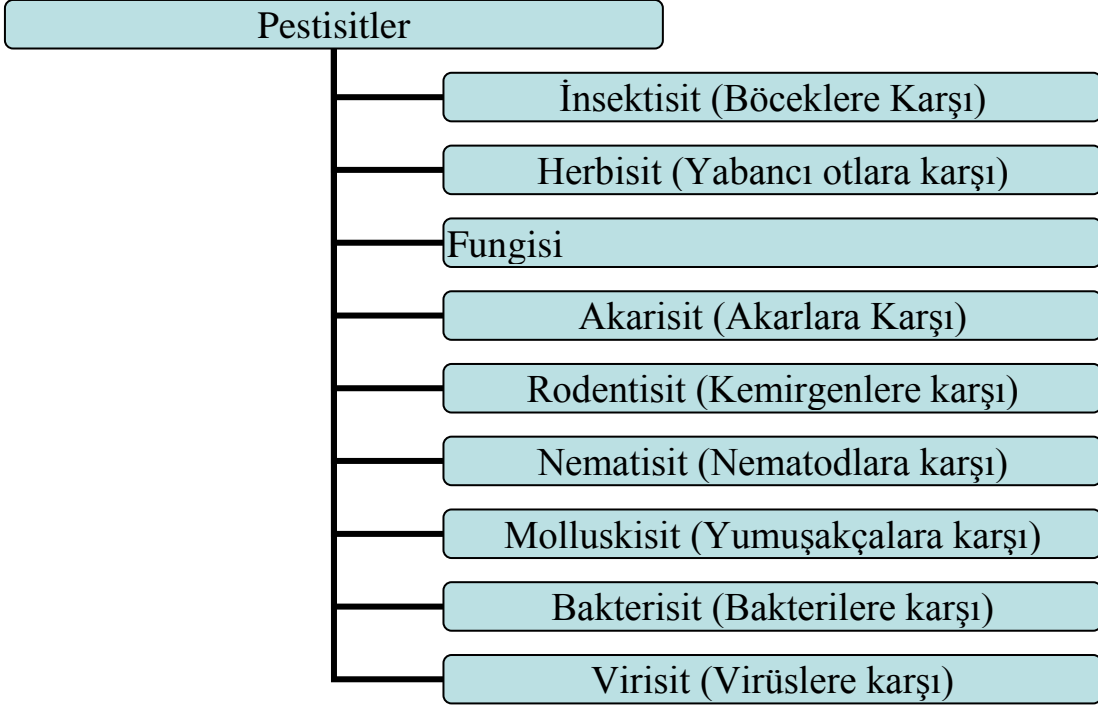
Ancak, pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve çevreye olumsuz etkileri gibi birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Tüm dünyada tarımsal sistemin ayrılmaz bir parçası olarak pestisit kullanımında tarımsal ürünlerde kalıntı riski ve çevreye olumsuz etki yapması dikkatle üzerinde durulması gereken bir konudur.

Aşırı ve bilinçsiz kullanım sonucu artan pestisit tüketimi çevre kirlenmesi ve insan sağlığı açısından çeşitli sorunların ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu sorunlar aşağıda sıralanmıştır.

- a) Pestisitler kanser, doğum anormallikleri, sinir sistemi zararları ve uzun dönemde oluşan yan etkilere neden olurlar,
- b) Pestisitler ve parçalanma ürünleri toksik maddeleri içerirler,
- c) Parçalanma ürünlerinden bazıları ana pestisitten daha toksik ve kalıcıdır,
- d) Uygulanan pestisite ve uygulama koşullarına bağlı olarak, çevre kirliliğine neden olmaktadır,
- e) Aşırı buharlaşabilenler soluduğumuz havayı kirletmektedir,
- f) Aşırı kullanımı organizmalarda ilaca karşı direnç oluşturmakta, pestisit uygulaması başarısız olmaktadır,
- g) Hedef alınan ve alınmayan zararlıların doğal düşmanlarını ve faydalı organizmaları da öldürerek yeni salgınlar oluşturmaktadır.

Her geçen gün tarıma elverişli alanlar giderek azalmaktadır. Bu yüzden birim alandan gelecek ürün miktarının artırılması gerekmektedir. Bu yöntemlerden biri de herbisitler ile kimyasal mücadele yöntemidir. Ancak, bu tarım ilaçlarının bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı sonucu çevrede oluşturduğu olumsuz etkiler günümüzün önemli sorunlarından biridir.

Her ne kadar kimyasal mücadele, tarımsal mücadelede bir yöntem ise de, tüm mücadele yöntemleri arasında en fazla kullanılanıdır. Çünkü kimyasal mücadele yüksek etkinliğe sahiptir, hızlı sonuç verir, bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomiktir ve ürünü toksin salgılayan organizmalardan da koruyabilir.



Şekil 2.1 : Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılırlar.

Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma şekilleri ise kullanıldıkları zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmalardır. Kullanıldıkları zararlı gruplarına ya da hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmada; en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir.

Şekil 1' de pestisitlerin hedef alınan organizmalara göre sınıflandırılması şematize edilmiştir. Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmalarında en önemlileri, organik klorlu pestisitler, fosforlular, karbamatlar, doğal ve sentetik piretroidlerdir.

Türkiye’de 2008 yılı sonu itibariyle 4100 adet ruhsatlı bitki koruma ürünü bulunmaktadır. Ülkemizde ruhsatlı etkili madde sayısı ise 418 adettir. Ancak AB (Avrupa Birliği) mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle, 01.01.2009 tarihi itibariyle 75 adet, 31.08.2009 tarihi itibariyle de 49 adet pestisit in imalatı ve ithalatı durdurulmuştur (www. kkgm.gov.tr). Şu anda AB’de kullanımdan kaldırılan, ama Türkiye’de hala piyasada olan 101 etkili madde kalmıştır.

2.2.1 Kirleticilerin Sucul Canlılarına Etkileri

2.2.1.1. Nörofizyolojik Etkiler

Organofosforlu bileşikler anti-kolinesteraz sinapsisler üzerinde olumsuz etki yapan kimyasallardır. Kolinerjik bağlantıdaki asetilkolinesteraz enziminin nörotransmitter olan asetilkolini parçalama görevi vardır. Yani bu enzimin nörotransmitter olan asetilkolini parçalanmadan kalmasını ve post-transmitter membran üzerinde kolinerjik reseptörlerin uyarıcı etkisinin sürmesini sağlar. Böylece kimyasal uyarı kısa sürede sona ermez ve uyarının sinapsisten normal geçiş şekli bozulmuş olur. Eğer bu fonksiyon bozukluğu yeteri kadar uzun süreli olursa uyarıyı post-sinaptik membran ve ötesine taşıyacak olan sistem çöker. Sinapsislerin bloke olması omurgalılarda tetanoz olarak bilinen kasların kasılması olayına neden olur. Bu şekilde canlının diyafram ve solunum kasları çalışmaz ve ölümüne neden olur. Anti-kolinesteraz omurgalılarda türe bağlı olarak hem merkezi hem de periferik sinir sistemi üzerinde etkili olabilmektedirler. Tipik belirtiler titreme, dolaşım ve solunum bozukluğu, koma hali, depresyon, çırpınma şeklinde ortaya çıkar.

2.2.1.2. Davranış Üzerine Etkileri

Toksikolojik olarak bakıldığında, özellikle güç fark edilen subletal etkiler üzerinde çalışılırken bunlar önemli kavramlardır. Farklı davranış şekilleri sürekli değişen günlük ve mevsimsel gereksinimler içinde belirli amaçları yerine getirir. Kirleticiler sucul canlıların özel dış uyartılara karşı tepkileri oluşturan belirli fizyolojik özelliklerini değiştirebilirler. Bu yüzden, kirletici kimyasal kaynaklı değişimler, zamana bağlı çevresel uyaranlara karşı canlının uygun olmayan tepkiler vermesine neden olarak, birey için ölümcül seviyenin altında kalsa da bir balık popülasyonunun uzun süreli

yaşamında zararlı etkilere yol açabilmektedir. Hormon reseptör bölgesine metal bağlanması gibi durumlar buna örnek olarak verilebilir. Bu olay çevresel uyarıya karşı yeterli hormon üretilmiş olsa bile belli bir davranışın ifadesi için gereken ara ürünlerin sentezini azaltır.

Sucul canlıların davranışı üzerine kirletici maddelerin etkileri konusunda ilk çalışmaları Atchison ve diğ. (1996)'da toplanmıştır. Hayvanların bütün davranışları kirliliğe karşı hassas olsa da çalışmalar daha çok beslenme ve tetikte olma durumundaki değişiklikleri izleme konusunda yoğunlaşmıştır. Beslenme davranışındaki uyumsuzluk besin alınmasında ve dolayısıyla besin üretiminde yetersizlik oluşmasına neden olmaktadır. Aynı şekilde dikkat eksikliği ve tetikte olma durumu azalmış bir canlı avcılara karşı korunmasız olmakta ve ölüm oranının artması ile sonuçlanmaktadır. Özet olarak, davranış üzerine kirletici maddelerin etkisi, azaltmış üretim ve artmış ölüm oranı demektir. Örneğin, Atchison ve diğ. (1996) iyonize radyasyon ve civaya maruz bırakılan *Gambusia affinis*' in (Sivrisinek Balığı) *Micropterus salmonides* (Küçük Ağızlı Siyah Levrek) tarafından avlanma riskini artırdığını rapor etmişlerdir. Aynı etki termal stres, insektisit, pentaklorofenol, flor ve kadmiyuma maruz kalan balıklarda da gözlenmiştir. Kimyasalların AChE inhibasyonuyoluyla sinir sistemini etkilediği ve bunun sonucu olarak davranış üzerinde olumsuzlar ortaya çıktığı görülmüştür. Söz konusu enzim aktivitesinin bozulması denge bozuklukları ve koordinasyon eksikliği oluşmasına sebep olmaktadır.

2.2.1.3. Çevresel Kirliliğin Populasyon Üzerine Etkileri

Çevresel ortama kirletici maddenin girişinden itibaren populasyonu oluşturan bireyler etkilenmeye başlar. Bu etki populasyonu oluşturan bireyler etkilenmeye başlar. Bu etki populasyon büyüklüğü üzerinde farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Populasyonu oluşturan bireyler üzerinde çok toksik bir etki ortaya çıkar ve canlılar ölmeye başlarsa populasyonda ki birey sayısı azalır ve hatta o bölgede populasyonun ortadan kalkmasına bile neden olabilir.

2.2.1.4. Organizmalara Üzerinde Kirleticilerin Etkilerinin Belirlenmesi Ve Çevresel Konsantrasyonlarla İlişkilendirilmesi

Ekotoksikologların amacı kirleticilerin organizma ve ekosistem üzerine etkilerinin ortaya koymaktır. Çalışmaların temeli biyokimyasal, hücresel, fizyolojik ve morfolojik parametreler olup çevresel gözlem için bir araç olup biyoişaretler olarak adlandırılmaktadır.

Kirleticilerin karasal ortamdaki etkileri bazı tırtılların gelişimi, ağaçların yaş halkaları incelenerek yapılan büyüme analizleri ve hayvanların davranış değişiklikleri incelenerek gözlemlenebilmektedir. Örneğin toprak kirliliğinin belirlenmesi için toprak solucanları (*Lumbricus terrestris*) çok sık kullanılmakta ve çeşitli pestisitlerle kirlenmiş topraktaki pestisit kalıntılarını analiz etmek yerine bu topraklarda tutulan toprak solucanlarındaki biyoişaretler incelenerek gözlemlenmektedir.

Tatlı sularda, organizma seviyesinde subletal etkilerin belirlenmesi için in-situ biyoassayler geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan gelişim verimliliği çalışmalarıdır. Stres altındaki organizmalar somatik büyüme ve üreme için yeterli enerjiye sahip değildirler. Bu durum kontrol grubuyla karşılaştırıldığında az büyüme ve az üreme olarak karşımıza çıkar. Tatlı sularda gelişim verimliliği ölçümleri genellikle amfipod ve isopod krustaseler de yapılmaktadır. Uzun süreli kirliliğin gözlemlenmesi ise kafeslere yerleştirilen balıkların fizyolojik değişimleri ölçülerek yapılmaktadır.

Deniz ekosisteminde sistemin büyüklüğü nedeniyle kirleticilerin etkisini belirlemek daha da zordur. Deniz kirliliğinin gözlemlenmesi için biyolojik etkilerin kullanılması konusunda derleme çalışması yapan Addison (1996) üç farklı biyokimyasal tepkinin (monooksijenaz salınması, metallothionein salınması ve AChE salınması), yumuşakçaklarda enerji dağılım ve bentik komünite yapısının analizinin kullanılmasını anlatmışlardır. Ayrıca etkisi çift kabuklular ve diğer molluskalarda erkek özelliklerinin ortaya çıkması da bir kirlilik göstergesidir.

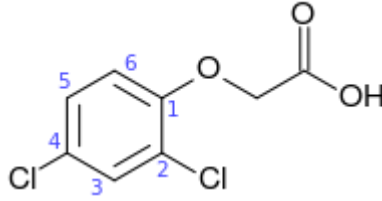
Ayrıca, balina ve diğer memelilerin plastik kirliliğinden ölmedikleri bunun yerine plastik kirliliğine maruz kalan bu canlıların bağışıklık sistemlerinin zayıflaması sonucu enfeksiyonlardan öldüğü ortaya konulmuştur.

2.3. 2,4-DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT (2,4-D)

Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi ve solunum gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarlar. 2,4-D yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir ve bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engeller. Ancak, bunu yaparken seçici olarak sadece yeşil yapraklı yabancı otları elimine eder.

Molekül Formülü	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Molekül Ağırlığı	221,04 g/mol
Suda Çözünürlüğü	900 mg/lt

Tablo. 2.1: 2,4-D'nin Özellikleri



Şekil. 2.2 : 2,4-Diklorofenoksiasetik asit

2,4-Diklorofenoksiasetik asit beyaz-sarı pul pul, toz, kristal ve katı madde halinde bulunabilir, fenolik aromaya sahiptir. Fenoksiherbisitler, ticari preparatlarda amin, ester ve tuzları türevlerinde bulunabilirler. Bununla beraber etkin maddesi serbest asit formudur. 2,4-Diklorofenoksiasetik asit birincil olarak tarım, ormancılık, çim alanlarının bakım uygulamalarının yanında eğlence alanları, parklar, golf sahaları, sokak alanları, endüstriyel arsalar ve bahçivanlıkta kullanılır.

Bu özelliklerinden dolayı tarımda birim alandan alınan verimin artırılması amacıyla piyasaya sunulan herbisitler bilinçsiz ve kontrolsüz kullanıldığında akut ve kronik zehirlenme, biyolojik dengenin bozulması, çevre ve besin kirlenmesi, insanlara ve hayvan türlerine yönelik teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkiler gibi birçok açıdan evrensel nitelikli çevre sorunlarına sebep olmaktadır.

2.4.Kılıç Kuyruğu (*Xiphophorus hellerii*) Balığı ve Biyolojik Özellikleri

2.4.1. Sistematikteki Yeri

Filum: Chordata

Subfilum: Vertebrata

Süperklasis: Osteichthyes

Klasis: Actinopterygii

Subklasis: Neopterygii

Infraklasis: Teleostei

Superordo: Acanthopterygii

Ordo: Cyprinodontiformes

Familya: Poeciliidae

Genus: *Xiphophorus*

Tür: *Xiphophorus hellerii* (Heckel, 1848)

2.4.2.Morfolojisi

Görünüş: İnce uzun balıklardır. Erkeklerde kılıç şeklinde kuyruk uzantısı bulunur. Çeşitli renklerde ırklar üretilmesine rağmen halen en tanınmışları kırmızı renklileridir. Erkekleri kuyruk hariç 10 cm. ve dişileri 12 cm. kadar büyüyebilir. Erkekler dişilerden daha ince yapılıdır ve gonopodları vardır. Ayrıca erkeklerin kuyruklarının alt kısmı kılıç şeklinde uzamıştır. Kuyruklarıyla beraber erkeklerin boyu en fazla 15 cm. olabilir.

Doğal örnekleri kahverengi ve yeşil renkli olmasına karşın seçici üretim yöntemleri ve melezleştirme çalışmaları sonucunda çok çeşitli ırklar elde edilmiştir.

En bilinen varyeteleri şunlardır: Fantom, gümüş, sarı, calico, tuksedo, siyah, yeşil, kırmızı, sarı, albino, lir kuyruk varyeteleridir.



Şekil 2.3. : Erkek Kılıç kuyruk balığı (*Xiphophorus hellerii*)



Şekil 2.4. : Dişi Kılıç kuyruk balığı (*Xiphophorus hellerii*)

Yaşama ortamı: Ömürleri 5 yıldır. Genelde diğer türlere karşı barışçıl balıklardır. Erkekler kendi aralarında kavgacıdırlar. Genellikle akvaryumdaki en büyük ve güçlü erkek diğerlerini ezerek hükmeder. Bu yüzden akvaryum çok büyük olmadığı sürece ya bir tek ya da saldırganlığın farklı hedeflere dağılması için en az 4 kılıçkuyruk erkeği bulundurulması önerilir.

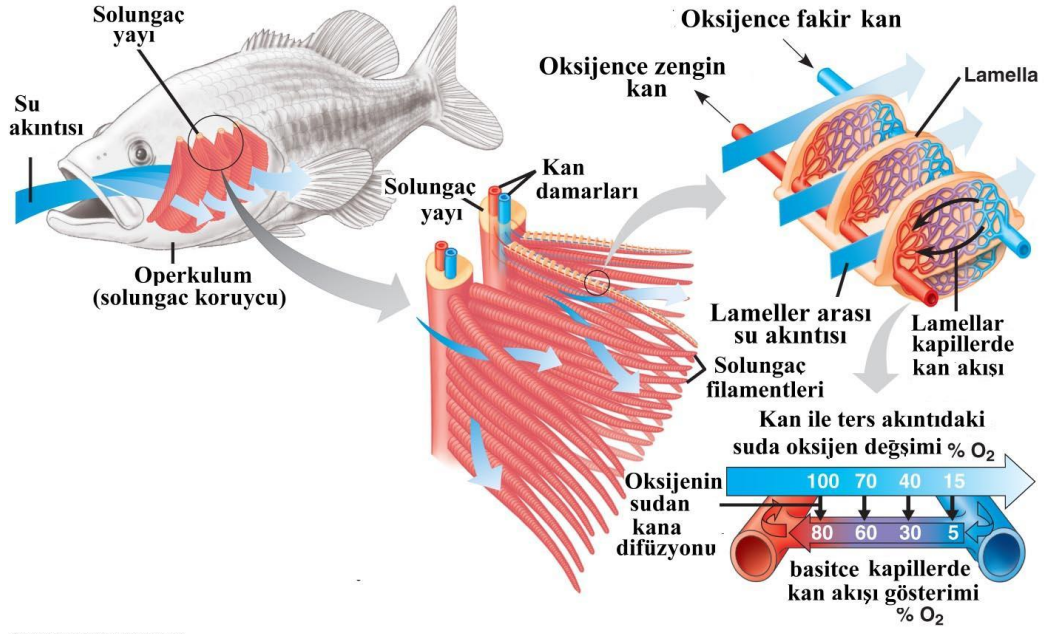
En uygun yaşam ortamları, 20-26°C sıcaklıktır. pH 6-8 arasında olmalıdır. En az 80 litrelik bir akvaryumda ve grup halinde bakılmaları önerilir. Bitkili akvaryumları severler.

Kılıçkuyrukların ilginç özelliklerinden biri de dişilerin erkeğe dönüşmesi özelliğidir. Yaşadıkları ortamda erkek kılıçkuyruk bulunmuyorsa baskın olan dişi kısa sürede erkeğe dönüşür. Bazen de hastalık atlatmış ve yaşlanmış dişiler durup dururken erkeğe dönüşebilir.

Erişkin bir dişi ortalama her ay 20-100 arasında yavru verebilir. Yavruları kesinlikle erişkinlerden ayırmak gerekir, av olabilirler. Yavrular artemia ile beslenmelidir. 3-4 aylıkken üremeye hazır hale gelirler. Kılıçkuyruk konusunda dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, akvaryumun üzerinin kapatılmasıdır. Akvaryumun üzeri hava alabilecekleri ama dışarı atlamalarını engelleyecek şekilde kapatılmalıdır. Bu balıklar sıklıkla tanktan dışarı atlayabilirler.

2.4.3. Balık Solungaçların Yapısı ve İşlevleri

Solungaçlar, yutak bölgesinde, her iki yanda uzanan yarıklar içinde bulunurlar. Teleost balıklar her bir tarafta 4 solungaç kemerine sahiptirler. Her bir kemer, solungaç filamentinin iki dizisine sahiptir. Bu dizilerin her birine “hemibrans” adı verilir. Her bir hemibrans, tarak benzeri dizilmiş, primer lamel olarak adlandırılan solungaç filamentlerinin bir dizisinden ibarettir. Her filamentin alt ve üst her iki yüzünde, filament eksenine dikey olarak oluşmuş ve filamentin enine ikincil katları olan, çok sayıda sekonder solungaç lameli bulunur. Solungaç lamellerinin serbest kenarları, çok ince tek tabakalı bir epitel ile örtülüdür.



Şekil 2.5: Balık Solungaçlarının Genel Yapısı

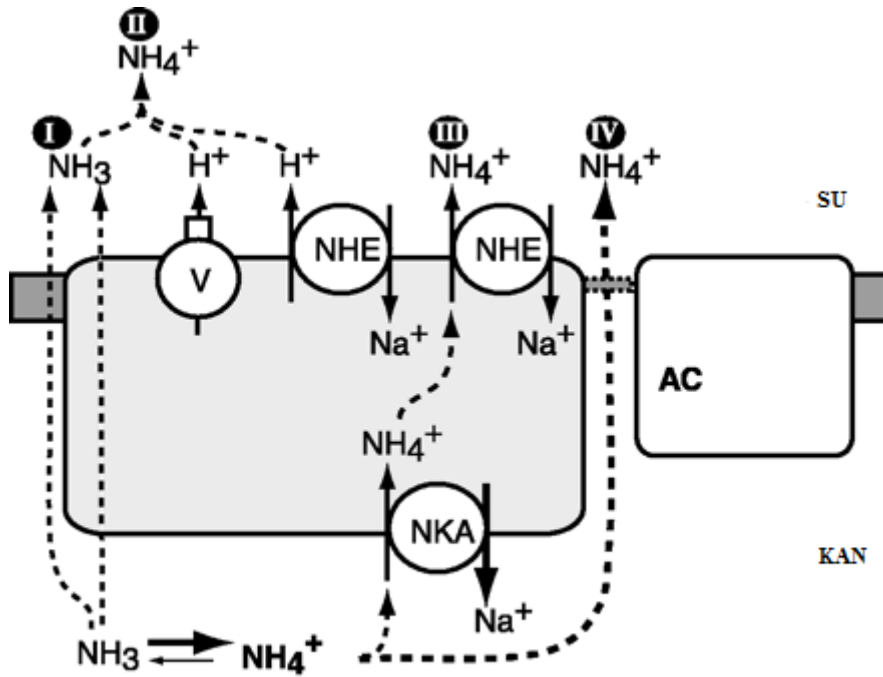
Su ve kan arasındaki gaz değişimi, solungaçlar ve genel vücut yüzeyi yapılmaktadır. Ancak solungaçların yüzey alanı, vücudun arta kalan yüzeyinden daha büyük olduğu için gaz değişiminde önemli bir yerdir. Solungaçların başlıca işlevi, solunum (gaz değişimi) yapmaktır. Ayrıca, elektrolitlerin aktif transportlarında, osmoregüasyonda, asit-baz dengesinde hayati öneme sahiptirler.

Balıklarda solunum suyu, genellikle ağız yolu ile girer ve solungaç açıklıklarından çıkar. Ağız boşluğu ile solungaç boşlukları arasındaki devamlı basınç farkı nedeniyle, su solungaçların üzerinden devamlı tek yön olarak akar. Solungaçlara gelen suyun hacmi balığın tür, büyüklük ve aktivitesi ile suyun sıcaklık, oksijen ve karbondioksit içeriği gibi birçok etkene göre değişir.

Oksijen, suda fiziksel bir eriyik halindedir. Oksijenin erime kapasitesi, ortam suyunun sıcaklığıyla ters orantılı olarak değişir. Oksijenin bir sıvıdan diğerine difüzyonu çok yavaş olduğundan, diğer omurgalılarda olduğu gibi, balıklarda da genellikle eritrositlerde gaz taşıyıcı özelliği olan hemoglobin bulunur.

Balıklarda protein metabolizmasının son ürünü amonyak ve üredir. Karaciğerde parçalanmış amonyak, kan yoluyla solungaçlara taşınır. Amonyak ve üre % 80-90 oranında solungaçlardan atılır. Suyun amonyak konsantrasyonu ve pH'sı balığın vücut sıvısından düşükse, amonyak solungaçlardan suya hızlı ve kolayca verilebilmektedir

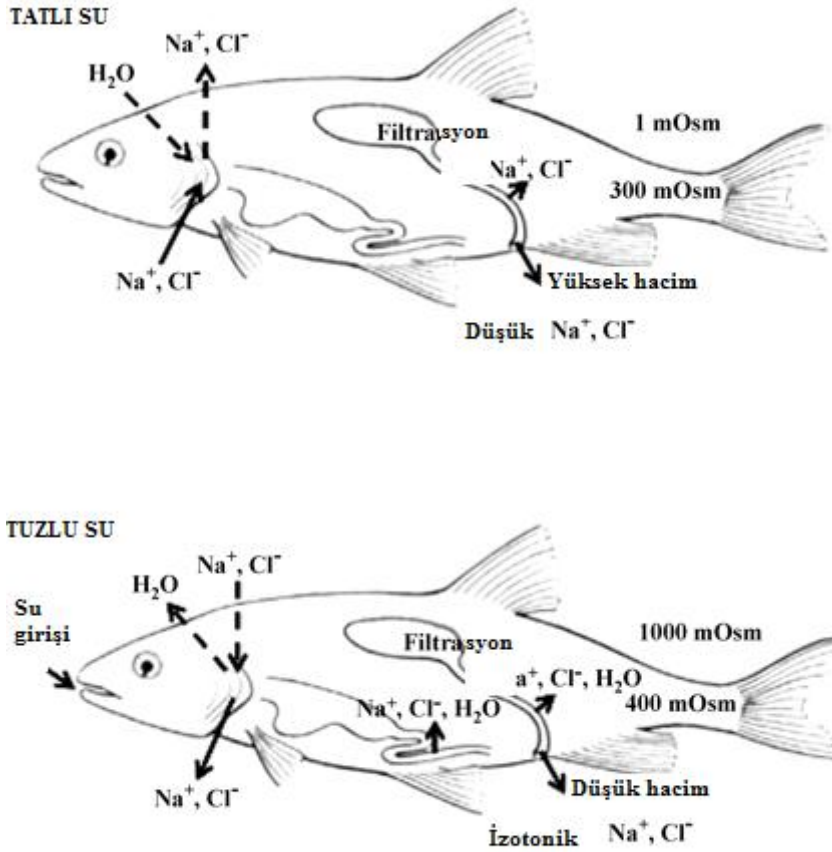
Teleostei'de solungaç epitelinde difüzyonla iyon değişimi mekanizması vardır. Bu balıkların tatlı su formlarında, solungaç epitelinden klorür iyonları girerken, bikarbonat iyonları kandan suya geçer; sodyum iyonları girerken de amonyum iyonları çıkar.



Şekil 2.6. : Solungaçlardan Amonyak Atılımı

Suyun vücuda alınması deniz ve tatlısu balıklarında farklı olduğu gibi, türler arasında da değişiklikler gösterir. Tatlısu balıkları genelde ihtiyaçları olan suyu ağız yolu ile almazlar. Bu balıklarda su, solungaçlardan girer. Deniz balıkları ise ihtiyaçları olan suyu ağızları ile alırlar. Tatlısu balıklarında kanda bulunan iyon miktarı, yaşadıkları su ortamındaki iyon miktarına göre zengindir. Bu nedenle tatlı su balıklarında su, vücuda solungaçlardan geçebilme özelliği gösterebilmekte ve bu de suyun ağız yoluyla alınmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Deniz balıklarında ise durum

tam tersinedir. Deniz balıklarının kanı, iyon yönünden oldukça fakirdir. Bu nedenle de tatlısu balıklarında olduğu gibi su, solungaçlardan vücuda geçme özelliği göstermez.



Şekil 2.7. : Balıklarda İyon Değişimi Mekanizması

Balıklarda solungaçlar çevre kirliliğinden ilk etkilenen organlardır. Geniş yüzey alanları toksik maddelerin geçişini kolaylaştırmaktadır. Solungaç hasarının derecesi toksik bileşiğin etki gücü ile doğru orantılıdır. Bilinen solungaç lezyonları iki ana gruba ayrılabilir; bunlardan ilki; bileşiğin yıkıcı etkileri, ikincisi ise savunma sonucu oluşurlardır.

Balıklar piretroidlere genellikle solungaç vasıtasıyla maruz kalırlar. Lipofilik aktiviteleri sayesinde piretroidler, sudaki düşük konsantrasyonlarında bile solungaçlardan kolaylıkla geçerler. Hücre membranında birikerek membrandaki lipid yapısını değiştirirler, protein ve lipid arasındaki hidrofobik iletişimi, proteinlerin yapısını, transport oranını ve enzim aktivitelerini değiştirirler.

2.4.4.Balıklarda Endokrin Sistem

Organik kirletici bileşenlerinin akuatik çevrede östrojenik etki göstermesi yaygındır. Bu tür bileşenler ksenoöstrojenler, östrojenik etki edenler, hormon gibi davrananlar ve endokrin bozucu kimyasallar olarak tanımlanırlar. Bu bileşenlerin gerçek potansiyelleri 17β -estradiol gibi endojen hormonlar ile az benzerdir fakat çevresel derişimleri zararlı biyolojik etki yapabilmeleri için yeterince yüksektir.

Normal endokrin fonksiyonlarını bozan bileşikler reproduktif fonksiyonların regülasyonundan sorumlu hormonal yolları bozma yeteneğindedir. Balıkların reproduktif endokrinolojisi hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini düzenleyen bir dizi kimyasal reaksiyon içerir. Bu eksen bir feedback sistem tarafından kontrol edilir ve östrojen gibi hormonların feedback sistemine hassastır.

Mevsimsel veya lokal işaretler sonucunda beyinde oluşan sinyaller hormon sekresyonundaki değişimler olarak hipotalamik-hipofiz sistem tarafından düzenlenir. Hipotalamustan salınan hormonlar (gonadotropin salınan hormon; GnRH, kortikotropin salınan hormon; CRH, tirotropin salınan hormon; TRH) hipofiz bezindeki salgı hücrelerinden hormonların salınmasına neden olur. Hipofiz bezinin bir kısmı olan gonadotropin (GtH), adrenokortikotropin (ACTH) ve tirotropin (TSH) salınır. Bunlar kendi hormonlarının salgılanmasını stimüle etmek için gonad, adrenal ve tiroid bezlerine etki eden peptid hormonlardır. GtH-I vitellogenoz veya spermatogenezde etkinken GtH-II indüklenen steroid olgunlaşmasının sentezini stimüle edebildiği sırada son gamet olgunlaşmasında etkindir.

Gonadotropinin ana rolü gonadları ve gonadların steroid salgılamasını stimüle etmektir. Bunlar sırasıyla eğer varsa ikinci seksüel karakterlerde, davranışlarda, kur

yapma hareketlerinde, gamet oluşumunda, gamet olgunlaşmasında ve en sonunda yumurtlamada değişiklikler başlatır. Östrojen, hipotalamus, hipofiz ve gonadlar üzerinde hem pozitif hem negatif etki yapabilir.

Endokrin bozucuların ters etki göstermeleri birkaç yolla olabilir:

1. Östrojen reseptörüne bağlanarak bloke edebilir veya hormon gibi davranabilirler,
2. Hormonu taşıyıcı proteinden ayırabilir ve proteini hedef hücreler için kullanılamaz hale getirebilirler,
3. Hormon sentezini etkileyebilirler,
4. Hücre membranı üzerindeki androjen reseptörler gibi diğer hormon reseptörlerini etkileyebilirler.

Bir kortikosteroid hormon olan kortizol, metabolizma ve immun fonksiyonlar üzerindeki etkileri nedeniyle tüm omurgalılarda homeostazisin önemli fizyolojik efektörüdür. Balıklarda kortizolün antigonadal etkisi vardır ve osmoregülasyonda önemli bir rol oynamaktadır.

Vitellogen ovipar omurgalılarda yumurta sarısının üretiminde kompleks öncü proteindir. Balıklarda vitellogen, yumurtalık östrojenlerin stimülasyonundan sonra karaciğerde sentezlenir kan dolaşımı ile yumurtalığa geçer ve oositlerle birleşir.

Vitellogen normal olarak olgun dişilerin kanında bulunmaktadır, erkek ve ergin olmayan balıklarda ise düşüktür. Hepatik vitellogen sentezinin doğal başlatıcısı 17 β -estradioldür.

17 β -estradiol spesifik östrojen reseptörüne bağlanarak östrojene uyumlu genleri regüle eder. Daha sonra östrojen-östrojen reseptör kompleksi hedef öncü genlerin östrojene uyumlu elementleriyle transkripsiyonel aktivitelerini module etmek için etkileşime girmektedir.

2.5. ARAŞTIRMA ARAÇLARI

2.5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

KİMYASAL ADI	MARKA
Sodium Phosphate Dibasic (Anhydrous, Na ₂ HPO ₄)	MOLYCHEM
Thiobarbituric Acid (C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S)	MOLYCHEM
Potassium Dihydrogen Phosphate (KH ₂ PO ₄)	MERCK
Citric Acid (Trisodium Dihydrate)	BIOMATIK
DTNB (5,51-Dithio-bis 2-nitrobenzoic asid)	ALDRICH
meta – Phosphoric acid	MERCK
E.D.T.A. Disodium % 35	MULTICELL
Hydrogen Peroxide % 35 (H ₂ O ₂)	MERCK
Trichloroacetic Acid (TCA) (CCl ₃ COOH)	PANREAC
Sodium Hydroxide (NaOH)	MERCK
n-Butanol (CH ₃ (CH ₂) ₃ OH)	MERCK
Sodium Chlorure (NACl)	MERCK
Bovine Serum Albumine (BSA)	SIGMA
Bradford Reaktifi	SIGMA
Hidroklorik Asit %37 (HCl)	MERCK

Tablo 2.2. : Kullanılan Kimyasal Maddeler

2.5.2. Kullanılan Cihazlar

CİHAZ ADI	MARKA
Spektrofotometre	BECKMAN COULTER DU® 730 Life Science UV/Vis
Santrifüj	BECKMAN COULTER Microfuge®18
Vortex	BIOSAN V-1 Plus
Manyetik Çalkalayıcı	VELP Scientifica
Su Banyosu Nüve	NB 9
Hassas Terazı Precia	XT 320M
Mikro- Dismembrator	U Sartorius
Santrifüj Nüve	CN 180
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA 3-18K
Derin Dondurucu (-80)	Thermo Scientific Forma 700 Series
Derin Dondurucu (-20)	Arçelik No Frost
Otomatik Pipet Seti	RAININ Pipet-lite

Tablo 2.3. : Kullanılan Cihazlar ve Marka İsimleri

2.5.3. Deney Materyali

2.5.3.1 Deney Materyalinin Gruplandırılması

Deney materyali olarak kullanılan ergin *Xiphophorus hellerii*, ticari akvaryumculardan satın alınmıştır. 10 litrelik cam akvaryumlarda uygun sıcaklık aralığında ve uygun havalandırma şartlarında tutulmuştur. Her grup 10 balıktan oluşacak şekilde dört grup oluşturulmuştur.

Fenoksiherbisitlerden olan herbisit 2,4-Diklorofenoksiasetik asit türü olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit düşük ve yüksek sublethal dozları balıkların akvaryum ortamına ilave edilmiştir.

Deney Grupları (n=10)	(2,4-D) Dozları
1. Grup	0,05 ppm
2. Grup	0,1 ppm
3. Grup	0,2 ppm
Kontrol Grubu	—

Tablo:2.4. : Deney Grupları ve Uygulanan Kimyasalların Dozları

Kontrol grubuna diğer şartlar aynı kalmak şartıyla herhangi bir kimyasal ilave edilmemiştir. Hayvanlar bu ortam sularında 96 saat tutulduktan sonra solungaç ve karaciğer dokuları alınıp, analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmiştir.

2.5.4 Araştırma Yöntemi

2.5.4.1 Doku Homojenatı Hazırlanması

Solungaç ve karaciğer doku örnekleri ayrı ayrı serum fizyolojik ile yıkanıp kanı temizlendikten sonra bir süzgeç kağıdı ile kurutulularak tartılıp ve kaydedilmiştir. Gerekli miktarda serum fizyolojik ile cam boncuk yardımıyla dismembratörde çok çabuk olarak homojenize edilmiştir. Doku homojenatı ayrı ayrı küçük kısımlara ayrılarak ependorf tüpleri içinde, gerekli bilgiler üzerlerine yazılarak derin dondurucuda çalışılacağı güne kadar saklanmıştır. Aynı gün çalışılacaksa +4 °C buzdolabında bekletilmiştir.

% 10 gramlık doku homojenatı için gerekli olan serum fizyolojik hacmi,

Nemli doku tartımı (mg)

Serum fizyolojik hacmi (ml) = ----- formülü ile

100

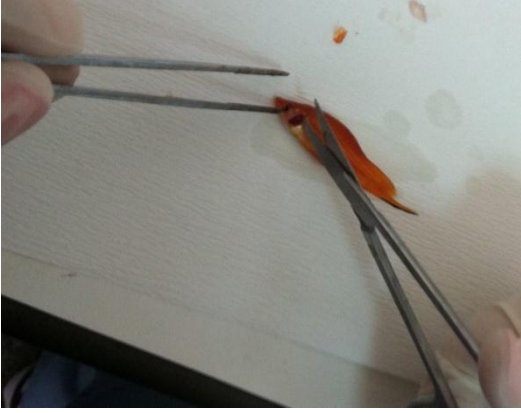
hesaplanmıştır.

Karaciğer ve solungaç homojenat tamponu (Balık solungaç ve karaciğer homojenat çözeltisi tamponu):

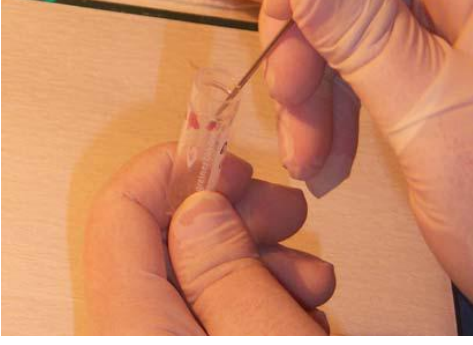
0.356 g sodyum fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 8.25 g sakkaroz bir miktar destile suda çözüldü. pH 8'e ayarlanıp toplam hacim 100 mL'ye tamamlandı.



Şekil 2.8: Genel Akvaryum Görünümü.



Şekil 2.9: Balıkların Solungaçlarının Alınması.



Şekil 2.10. : Doku Steril Ependorf Tüplere Konur.



Şekil 2.11. : Doku Dismembratörde Parçalanır.



Şekil 2.12. : Örneklerin Santrifüj Edilmesi



Şekil 2.13. : Örneklerden Süpernatant Elde Edilmesi.

2.5.5 Biyokimyasal Parametreler için Kullanılan Tayin Yöntemleri

2.5.5.1 Solungaç Ve Karaciğer Dokularında Protein Tayini (Bradford Yöntemi).

Prensip: Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanması sonucunda oluşturduğu renkli çözeltilerin 595 nm’de absorpsiyonunun ölçülmesi ilkesine dayanır.

2.5.5.2 Gerekli çözeltiler:

- % 10 mg albümin stok çözeltisi: 10 mg albümin biraz distile suda tamamen çözüldükten sonra hacmi 100 ml ye distile su ile tamamlanır.
- Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 20, 40, 60, 80 µg albumin ihtiva edecek şekilde distile su ile seyreltilerek hazırlanır.
- Bradford reaktifi: Orijinal şişesinden kullanılır.

Deneyin yapılışı: 6 deney tüpü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3), standart 4 (St4) ve kör (K) olmak üzere işaretlendi ve çalışıldı. Vortekste iyice karıştırıldı, oda sıcaklığında 15 dk. bekletildi. 15 dk. Sonunda 595 nm de köre karşı absorbanslar kaydedildi.



Şekil 2.14. : Hazırlanan Çözeltiler Vortekslenir.

Hesaplama: Standart grafiği yardımıyla protein miktarı hesaplanmıştır.

Ölçüm şu şekilde gerçekleştirildi; 1 mL’inde 1 mg protein ihtiva eden standart albumin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 ml alındı. 100 mL’nin altındaki tüm tüplerin hacmi saf su ile 0.1 mL’ye tamamlandı. 5 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifi tüplere ilave edildi ve vorteks mikser ile karıştırıldı. 10 dk inkubasyondan sonra 595 nm’de 3 mL’lik küvetlerde köre karşı absorbans değerleri okundu. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL coomassie brilliant blue G-250 reaktifinden oluşan karışım kullanıldı.

Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen mg protein değerleri standart grafik halinde verildi. Hazırlanan enzim çözeltilerinden (solungaç ve karaciğer) ayrı ayrı 0.1 mL alındı. 5 mL coomassie reaktifi ilave edildi ve vorteks ile karıştırılarak inkubasyona bırakıldı. sonra, okundu. Her bir ölçüm 2 kez tekrar edildi. Kör olarak 0.1 mL aynı tampon ve 5 mL coomassie reaktifinden oluşan karışım kullanılarak 595 nm’de absorbans değerleri okundu. Her bir enzim çözeltisi için bulunan absorbans değerleri standart grafikten mg protein değerine çevrildi.

2.5.5.3 Solungaç ve Karaciğer Dokularında AChE Tayini

İki tüp alındı ve tüplerin her birine 0.1 mL DTNB belirteci ve 0.1 mL uygun seyreltilmiş enzim konuldu. Tüplerden kör olarak kullanılacak olan 65 °C'deki su banyosunda 3 dakika tutularak enzim inaktive edildi. Daha sonra tüplerin her birine 2.7 mL 0.05 M pH 8'deki sodyum tamponu ilave edildi. Tüpler karıştırıldı ve 5 dakika 37 °C'de ön inkübasyona tabi tutuldu. Her bir tüpe 0.1 mL 3 mM'lik substrat (asetiltiyokoliniyodür) çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Tüpler tekrar karıştırıldı ve 10 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 10 dakika sonra tüplerin 412 nm'deki absorbansları ölçülerek absorbanslarındaki artış miktarı bulundu.

2.5.5.4 5, 5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi Hazırlanışı:

8.75 g sodyum fosfat ve 1.5 g NaHCO₃ yaklaşık 950 mL distile suda çözüldü, pH 7'ye ayarlandı ve bu çözeltide 3.96 g DTNB çözülerek hacmi destile su ile 1 litreye tamamlandı.

2.5.5.5. Asetiltiyokolin çözeltisi Hazırlanışı:

0.50868 g asetiltiyokoliniyodür alındı bir miktar 0.05 M (pH=8) sodyum fosfat tamponu içinde çözüldü. Hacmi aynı tampon ile 100 mL'ye tamamlandı.

2.5.5.6. 3 mM 50 mL butiriltiyokolin iyodür substratının hazırlanışı:

0.0476 g butiriltiyokolin iyodür 20 mL 0.05 M (pH 8) sodyum fosfat dihidrat tamponu içinde çözüldükten sonra solüsyon, aynı tampon ile 50 mL'ye tamamlandı.

İnkübasyondan sonra örneklerin absorbans değerleri, spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda kör örneğe göre sıfırlama yapıldıktan sonra, okundu. Her bir ölçüm 2 kez tekrar edildi.

2.5.5.7. 0.05 M, pH 8 sodyum tamponun hazırlanışı:

8.75 g sodyum fosfat dihidrat (NaH₂PO₄.2H₂O) 900 mL distile suda çözüldü ve 1 N NaOH çözeltisiyle pH 8'e ayarlandı. Daha sonra solüsyon distile su ile 1 litreye

tamamlandı. Tüpler 37 °C’de 5 dk su banyosunda ön inkübe edildi. AChE aktivitesi için her iki tüpe 100 µL (3 mM) substrat olarak asetiltiyokolin iyodür; (UV-1201 UV VIS Spectrophotometer Shimadzu)’nin kuvvetlerine aktarıldı. Cihaz kör örneğe göre sıfırlanarak numune absorbans değeri 412 nm dalga boyunda okundu. Daha sonra kuvvetlerdeki solüsyonlar tekrar tüplere alındı ve 37 °C’de 10 dk su banyosunda inkübe edildi.

2.5.5.8. İzotonik Çözelti Hazırlanışı:

9 g. NaCl alındı yaklaşık 950 mL distile suda çözüldü ve hacmi distile su ile 1000 mL ye tamamlandı.

2.5.5.9. 3 mM 50 mL butiriltiyokolin iyodür substratının hazırlanışı:

0.0476 g butiriltiyokolin iyodür 20 mL 0.05 M (pH 8) sodyum fosfat dihidrat tamponu içinde çözüldükten sonra solüsyon, aynı tampon ile 50 mL’ye tamamlandı.

İnkübasyondan sonra örneklerin absorbans değerleri, spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda kör örneğe göre kalibrasyon yapıldıktan sonra değerler okundu. Her bir ölçüm iki kez tekrar edildi.



Şekil 2.15. : Örneklerin Su Banyosunda İnkübasyonu.



Şekil 2.16. : Örneklerin Santrifüj Edilmesi.



Şekil 2.17. : Örneklerin Spektrofotometrede Ölçümlerinin Yapılması.

Bulunan bu sonuçlar daha sonra;

$$\Delta OD \text{ VC}$$

$$A = x \times f$$

$$13.6 \text{ VE}$$

$$A = \text{mL başına enzim ünitesi}$$

$$\Delta OD = 412 \text{ nm'de optik dansitenin dk. başına değişimi}$$

$$\text{VC} = \text{Küvet hacmi}$$

$$\text{VE} = \text{Küvetteki saf enzim çözeltisi hacmi}$$

$$f = \text{Seyreltme faktörü}$$

13.6 = 412 nm'de ve 37 Co de 3 mM Asetiltiyokoliniyodür'ün indirgenmesi sonucu okunan OD, sabit değeridir.

2.2.6. İstatiksel Analiz

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 16.0 paket programında Shapiro-Wilk testi kullanılarak $P < 0.05$ önem derecesinde belirlenmiştir.

BÖLÜM 3

BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. BULGULAR

Balık solungaç karaciğer doku örnekleri literatürde belirtilen şekilde uygun tampon ortamına alınmıştır. Daha sonra santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiş, homojenat bu haliyle ölçüm yapılmak üzere soğuk ortamda bekletilmiştir. Bu homojenatların enzim aktiviteleri Ellman metoduna göre (Ellman, 1961) belirlenirken, kantitatif protein tayinleri ise Bradford metoduna göre (Bradford, 1976) tayin edilmiştir. Bulunan bu değerlerden spesifik aktivite hesaplanmıştır. Çalışmamızda kullanılan Bradford yöntemi; organik boyaların, proteinlerin asidik ve bazik gruplarıyla etkileşerek renk oluşturmasını esas alır. Boya bağlama temelli yöntemlerin en yaygını, Bradford tarafından geliştirilen ve Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının kullanıldığı metottur (Bradford, 1976).

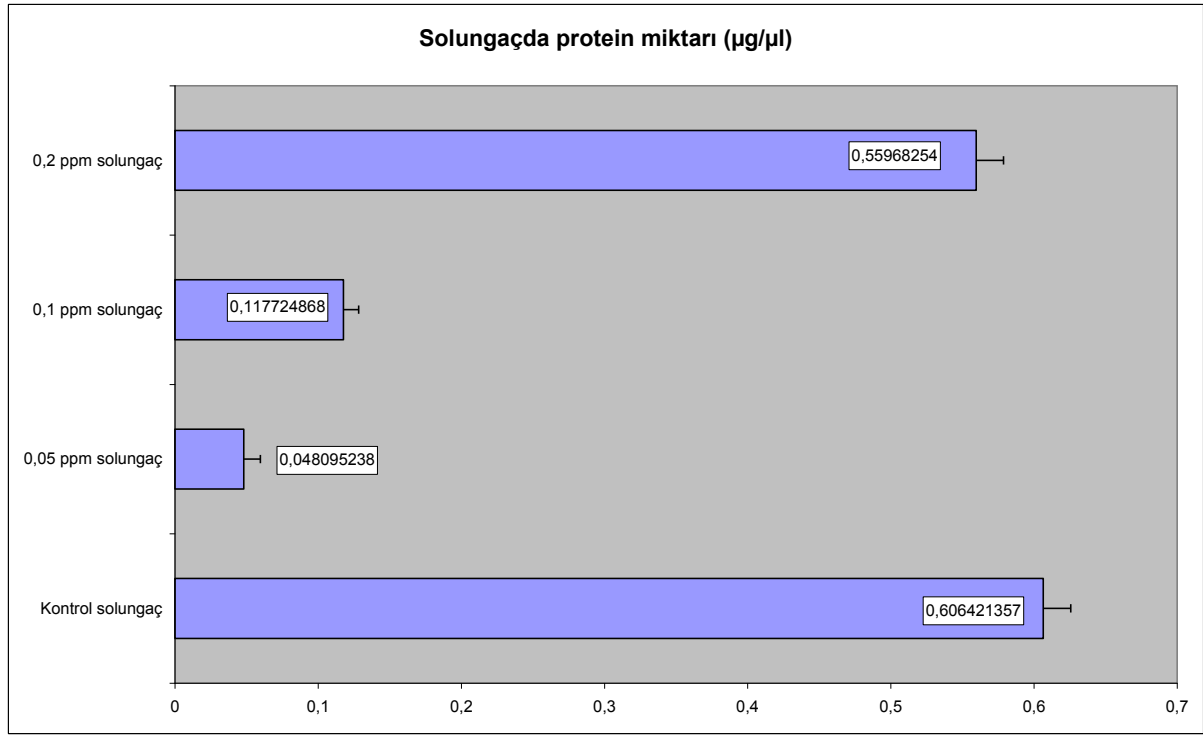
Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant Blue G-250 negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Boyanın kırmızı (maksimum dalga boyu 465 nm) ve mavi (maksimum dalga boyu 596 nm) formu mevcuttur. Proteinin bağlanması, kırmızı formun mavi forma dönüşümünü sağlar. Bu yöntemin bozucu faktörlere hassasiyeti oldukça azdır. Reaksiyon yüksek oranda tekrarlanabilir ve hızlı cereyan eder. Reaksiyon iki dakikada tamamlanır. Renk stabilitesi iki saatin üzerinde devam eder.

Çalışmamızda Asetilkolinesteraz aktivitesi Ellman yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntem, hafif alkali ortamda, 5,5 ditiyobis 2-nitrobenzoik asidin (DTNB, Ellman reaktifi), dokudaki alifatik tiyol bileşikleriyle reaksiyonu sonucu her molekül tiyol başına oluşan, p-nitrofenol anyonunun miktarının spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Substrat olarak tiyokolin esteri kullanılmıştır. Metodun esası, reaksiyon esnasında oluşan sarı renkli anyon (2 nitro-5 tiyo benzoat)' un pH 8' de 412 nm de ölçülmesi esasına dayanır (Ellman,1961). Bu yöntem asetilkolinesteraz aktivitesi ölçümünde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Hemen hemen bununla ilgili bütün çalışmalarda bu yöntem kullanılmaktadır.

2,4-Diklorofenoksiasetik asitin özellikleri farklı subletal dozlarına (0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,2 ppm) 96 saat süresince maruz bırakılan *Xiphophorus hellerii* 'nin solungaç ve karaciğer dokularında AChE aktivitesi ile protein miktarları grafikler halinde sunulmuştur. Verilerin daha kolay yorumlanabilmesi için yüzde değişim grafikleri de hazırlanmıştır.

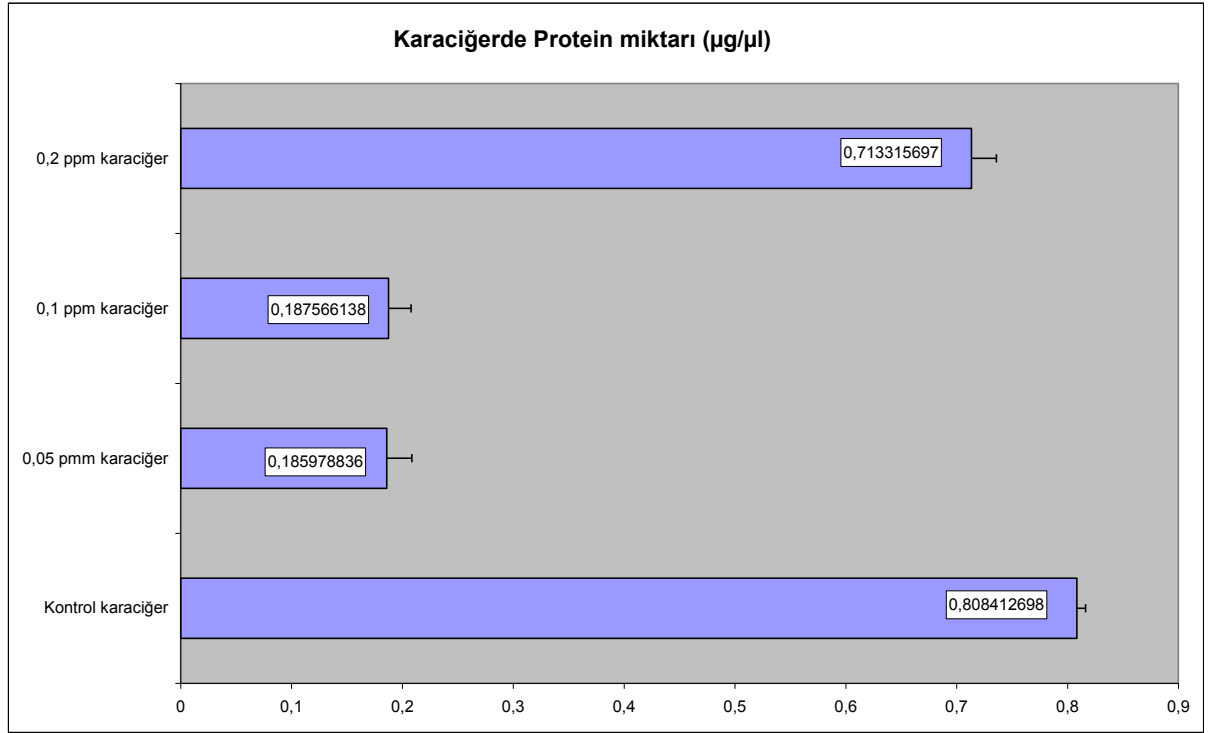
3.1.1. Solungaçlar ve Karaciğerde Protein Tayini

Solungaç ve karaciğer dokularında protein tayini, BSA kullanılarak hazırlanan standart grafik üzerinden hesaplanmıştır.



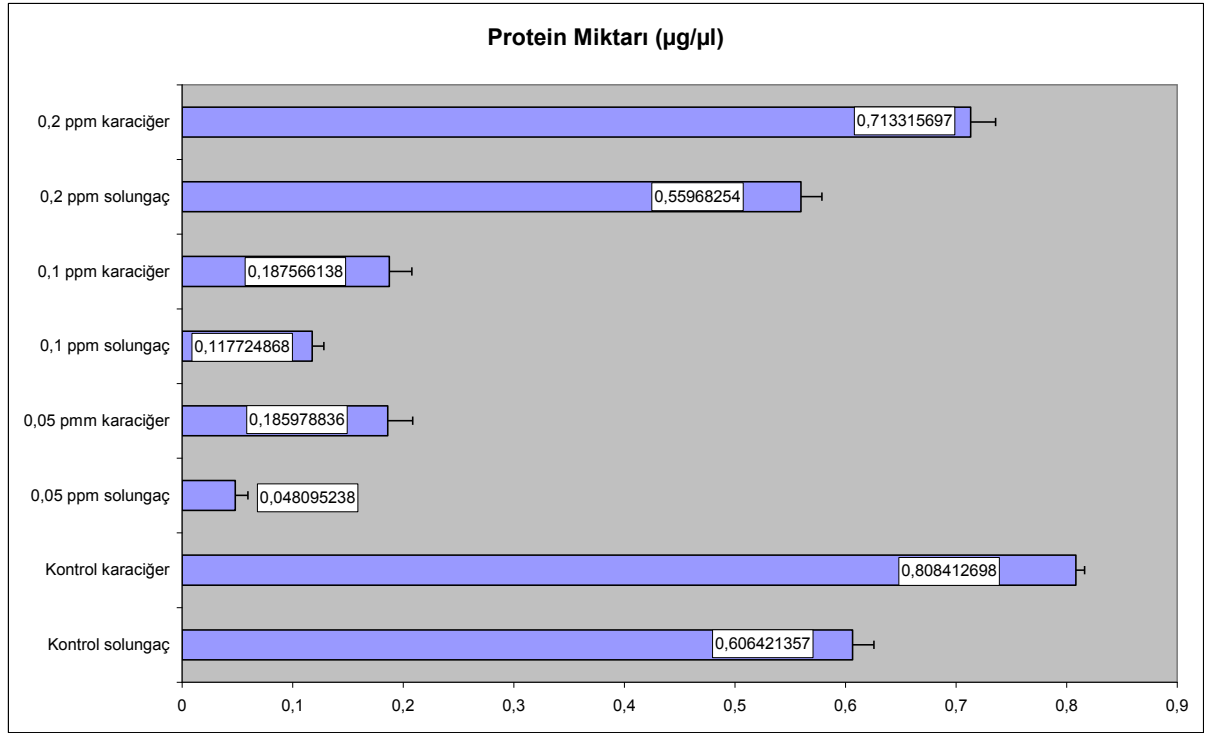
Şekil 3.1: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında Protein Miktarları.

Farklı subletal dozlarda 2,4-Diklorofenoksiasetik asite maruz bırakılan *X. hellerii* solungaçlarında protein miktarlarının, kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir.



Şekil 3.2: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Karaciğerlerinde Protein Miktarları.

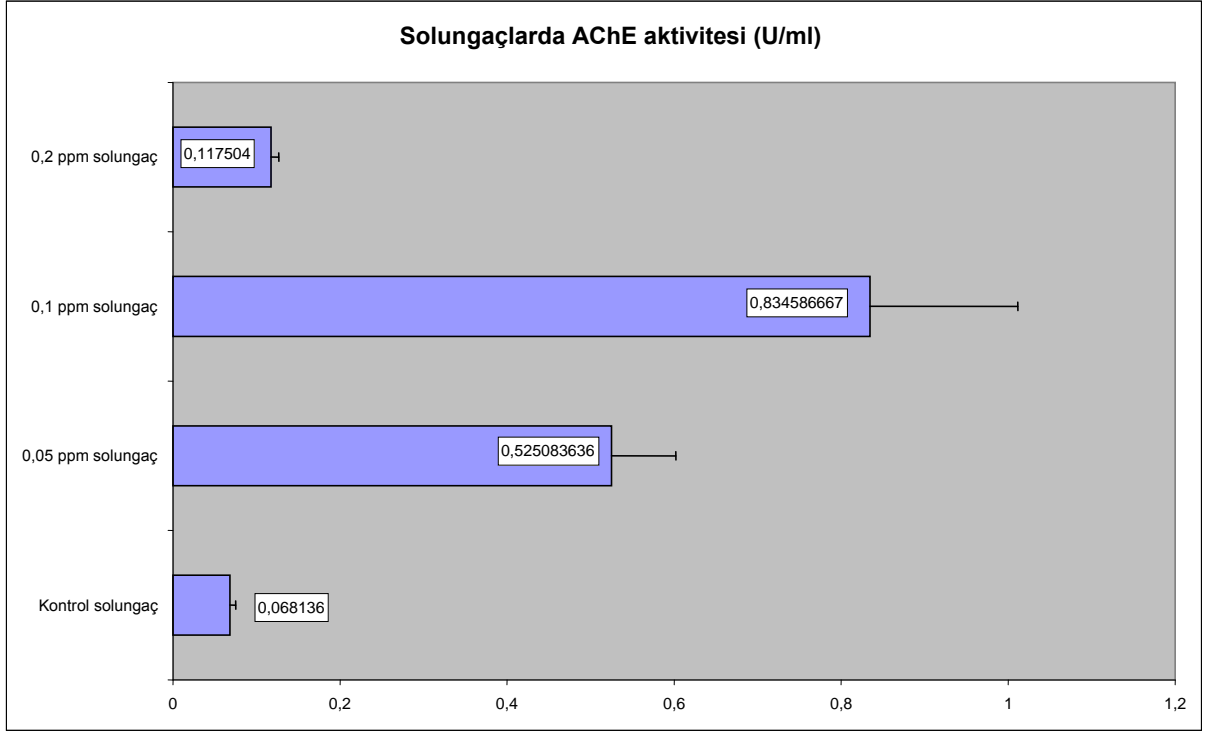
Farklı subletal dozlarda 2,4-Diklorofenoksiasetik asite maruz bırakılan *X. hellerii* karaciğerlerinde protein miktarlarının, kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir.



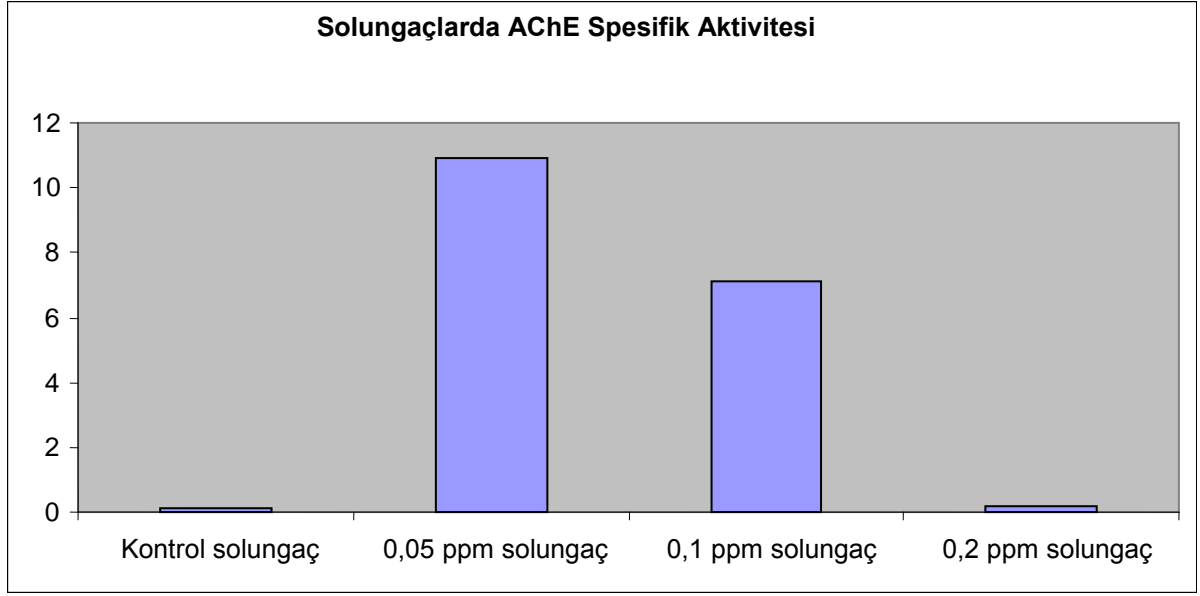
Şekil 3.3: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde Protein Miktarları.

3.1.2. Solungaçlar ve Karaciğerde AChE Tayini

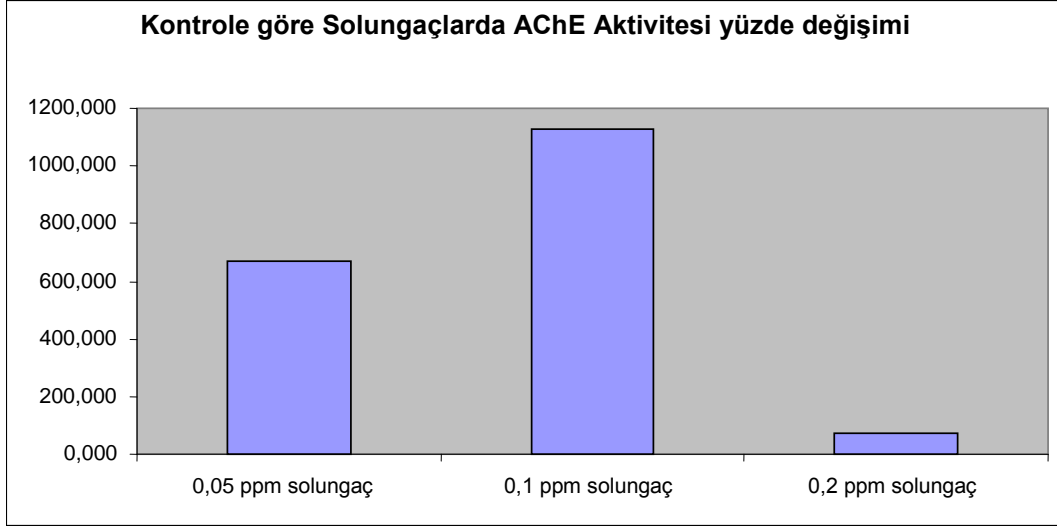
Solungaç ve karaciğer dokularında AChE tayini, BSA kullanılarak hazırlanan standart grafik üzerinden hesaplandı.



Şekil 3.4: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında AChE Miktarları.

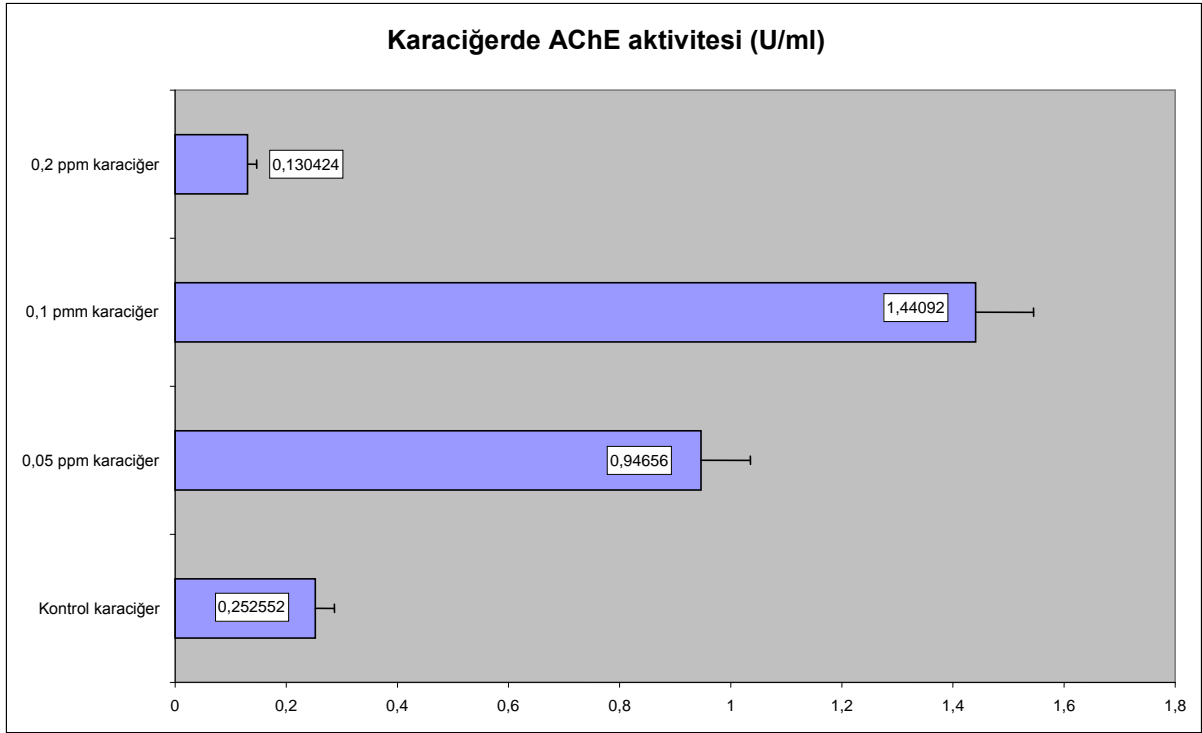


Şekil 3.5: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında AChE Spesifik Aktivitesi.

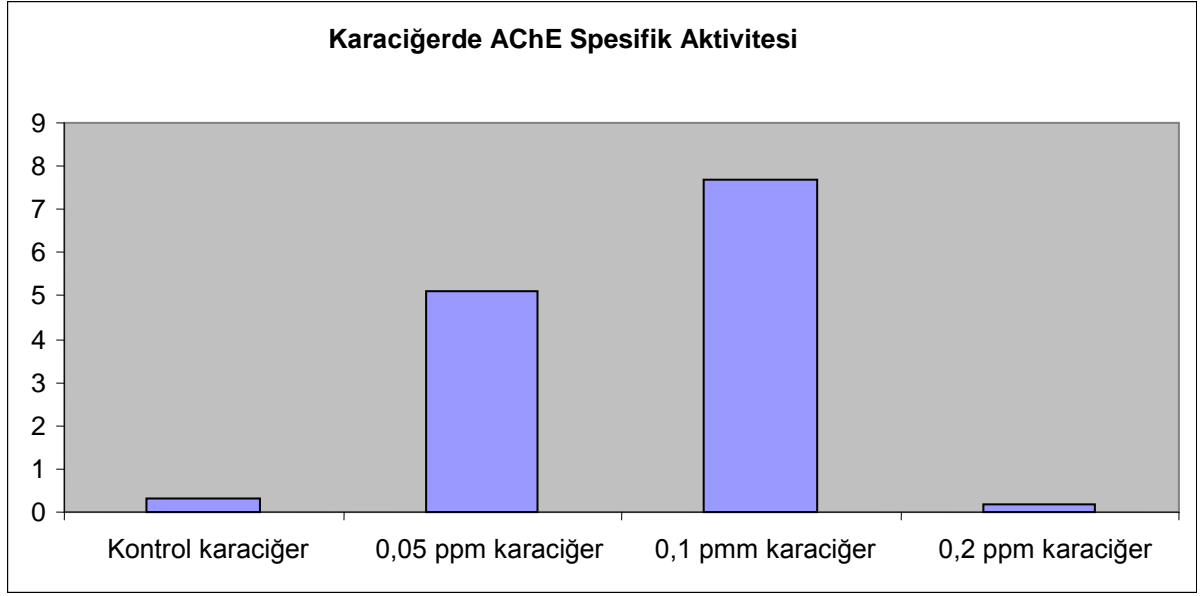


Şekil 3.6: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında Kontrole Göre AChE Miktarları.

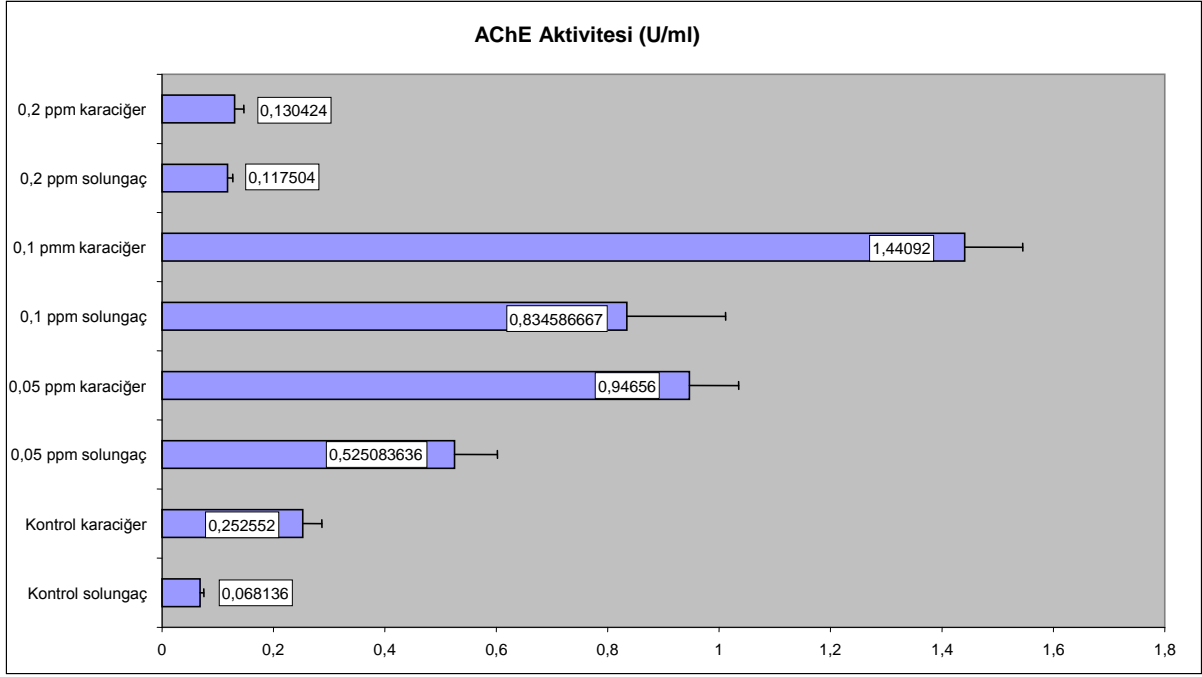
Farklı subletal dozlarda 2,4-Diklorofenoksiasetik asite maruz bırakılan *X. hellerii* solungaçlarında AChE miktarlarının, kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir.



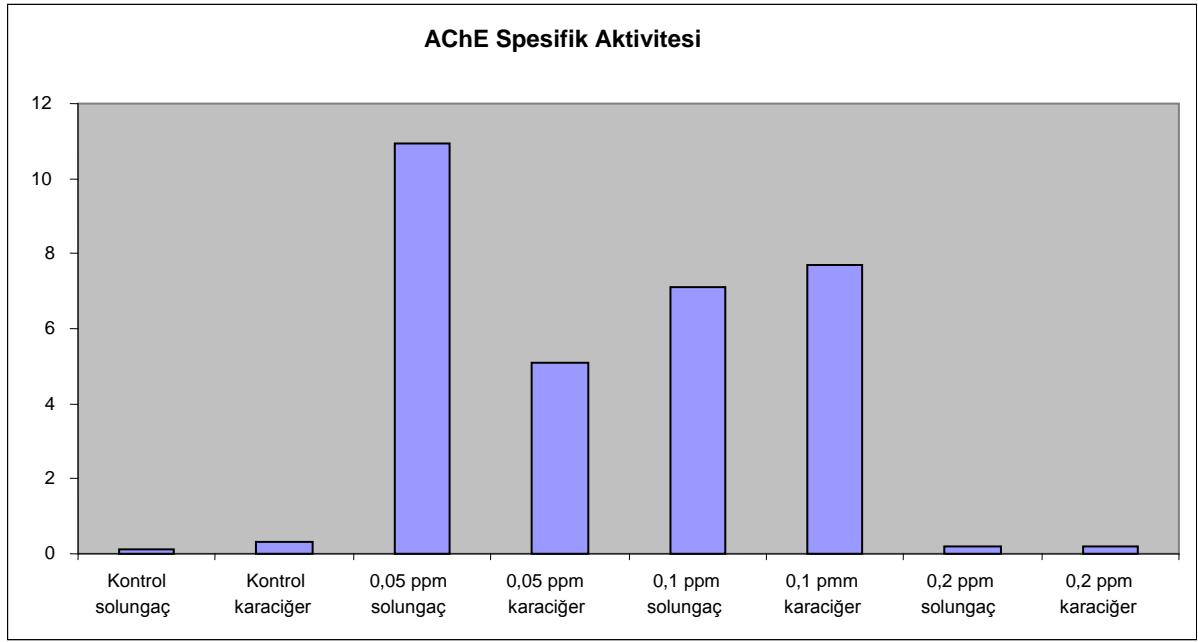
Şekil 3.7: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Karaciğerlerinde AChE Miktarları.



Şekil 3.8: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında AChE Spesifik Aktivitesi.



Şekil 3.9: 2,4-Diklorofenoksiasetik Asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde AChE Miktarları.



Şekil 3.10: 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin Farklı Subletal Dozlarının Etkisinde *X. hellerii* Solungaçlarında ve Karaciğerlerinde AChE Spesifik Aktivitesi.

3.2. TARTIŞMA

Bir çalışmada Karadeniz Bölgesinde kullanılan pestisitlerden karbosulfanın (250 g/L, EC) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nın enzim aktivitesi üzerine olan kronik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla ortama alıştıran gökkuşağı alabalıkları (116.88 ±21.69 g ve 22.39 ±1.40 cm) 60 gün süreyle akarsu sisteminde (6 L/h) karbosulfanın toksik etkisine maruz bırakılmıştır. Daha önceki denemelerden elde edilen veriler dikkate alınarak, test balıklarının buldukları ortamda karbosulfan miktarı 35 µg/L olacak şekilde düzenleme yapılmıştır. Kronik test süresince gökkuşağı alabalıklarının eritrosit asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi ölçülerek inhibisyon oranı tespit edilmiştir. Gökkuşağı alabalıklarının enzim aktivitelerindeki değişimin istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır (p<0.05). AChE inhibisyon oranındaki artış 3. haftaya kadar sürdüğü ve inhibisyon oranının % 41.32 olduğu tespit edilmiştir. Enzim aktivitesindeki değişimin balıkların davranışları üzerine etkili olduğu da belirlenmiştir. E. Çapkın (2011).

Başka bir çalışmada da zirai mücadele yöntemleri içinde yabancı otlarla mücadelede çok yaygın olarak kullanılan 2,4-D herbisitinin oral kullanımının sıçan testislerinde oluşturduğu histopatolojik etkilerini incelemektir. Bu amaçla, yaklaşık 200-250 gr ağırlığında olan Wistar Albino erkek sıçanlar kontrol, düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere her biri 6 sıçan içeren 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu sıçanlara standart pellet yem verilirken düşük, orta ve yüksek doz 2,4-D sırasıyla 20, 40, 80 mg/kg dozda laboratuvar pellet yemlerine emdirilerek 28 gün boyunca oral yolla verilmiştir. Tüm sıçanlar intrakardiyak perfüzyonla tespit edilmiştir. Deneklerin testis dokuları rutin ışık mikroskopu takibi için alınmış ve incelenmiştir. Deney gruplarında dozla doğru orantılı olarak seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenik hücre sırasında bozulma ve yüksek doz gruplarında testis hasarları saptanmıştır. Ayrıca, tunika albuginea'da ve seminifer tübül epiteli çapında azalma ve spermatogenik hücrelerin lümenine dökülmesine neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, 2,4-D testis dokusunda histopatolojik hasara neden olmuştur.

E. Özdaş (2006).

Başka bir çalışmada da piava balığının (*Leporinus obtusidens*) yaşam ortamına 96 saat süreyle 2,4-D verilmiştir. Kas,beyin ve karaciğer dokularında ki AChE aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubuna göre AChE aktivitesi kas ve beyin dokularında azalmıştır. Karaciğer dokularında kontrol grubuna göre, laktat ve protein miktarları önemli ölçüde azalmıştır. Bu azalmaların nedeni ise; 2,4-D eklenen ortamda balıkların strese girmesi ve metabolik faaliyetlerini gerçekleştirememesidir.

M. Fonseca (2008)

Bir başka çalışmada sarı yılan balığının (*Anguilla anguilla*) yaşam ortamına 96 saat süreyle pestisit eklenmiştir. Eklenen Pestisit toplam AChE aktivitesi üzerine önemli bir inhibitör olmuştur ve AChE aktivitesini % 35 ile % 75 oranında artırmıştır.

E. Sancho (2000)

2,4-D gibi pestisit grubu olan herbisitler, balık metabolik ve toksikolojik parametrelerini etkileyebilirler. Bir başka çalışmada ise; piava balığının yaşam ortamına (*Leporinus obtusidens*) 90 gün boyunca 2,4-D herbisiti eklenmiştir. Kontrol grubuna göre; beyin ve kas spesifik AChE aktivitesi, karaciğerde ise katalaz aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Bu sonuçlar bizlere herbisitlerin balıklar için toksikolojik olduğunu göstermektedir.

S. Moraes (2009).

Diğer bir çalışmada piava (*Leporinus obtusidens*) balığının beyin, kas ve karaciğer dokularında AChE aktivitesini incelemek için; yaşam ortamına 3, 6, 10 ve 96 saat süreyle 20 mg / L (yabancı otlarla mücadelede kullanılan ve herbisit içeren bir ot ilacı olan) roundup eklenmiştir. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi beyin dokusunda azalma karaciğer dokusunda artma göstermiştir.Kas dokusunda ise anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir. Ayrıca dokularda amonyak düzeyleri önemli ölçüde artmıştır.

L. Gluszczak(2006).

Asetilkolinesteraz (AChE) üzerine herbisitlerin etkisi incelenmiştir. Bir herbisit çeşidi olan klamazon, gümüş kedi balığının (*Rhamdia quelen*) ortamına eklenmiştir. Çalışmada ki amaç beyin kas ve karaciğerde TBARS (Tiyobarbitürat reaktif maddeler) oluşumunun etkilerini incelemektir. Klamazona maruz kalan balıklar maruz kalma süreleri boyunca karaciğerde TBARS üretim artmış beyin ve kasta iste azalmıştır.

M. Crestani (2007)

Başka bir çalışmada da piava balığının (*Leporinus obtusidens*) yaşam ortamına herbisit olan klamazon eklenmiş ve AChE aktivitesi incelenmiştir. Balıkların yaşam ortamına 30 gün boyunca herbisit eklenmiştir. Beyin ve kas dokularında AChE aktiviteleri incelenmiştir. Beyinde AChE aktivitesi azalmıştır ancak, kas dokusunda önemli ölçüde artmıştır. TBARS beyin ve kas dokularındaki düzeylerinin azaldığını

S. Moraes (2007)

Bir başka çalışmada ise moli balığının (*Prochilodus lineatus*) yaşam ortamına 96 saat boyunca, herbisit olan Roundup eklenmiş ve kas beyin ve karaciğer dokularında ki AChE aktiviteleri incelenmiştir. Dokuların tümünde AChE aktiviteleri inhibisyona uğramış ve düşmüştür. Roundup AChE aktivitelerini inhibe ederek bir kirletici olarak davrandığını göstermiştir.

A. Modesto (2010)

Bir diğer çalışmada da sazan balığının (*Cyprinus carpio*) yaşam ortamına 7, 30 ve 90 gün boyunca herbisit çeşidi olan imazetapir eklenmiştir. Beyin kas ve karaciğer dokularında AChE aktiviteleri araştırılmıştır. İmazetapirin 7 günün sonunda, beyinde AChE aktivitesini artırdığı, kas dokusunda ise AChE aktivitesinde önemli ölçüde azalma meydana getirmiştir. 30 günün sonunda beyinde AChE aktivitesi düşmüş kas dokusunda ise AChE aktivitesinde artma görülmüştür. 90 günün sonunda ise kas dokusunda da AChE aktivitesi azalmıştır.

S. Moraes (2011)

Tarımda pestisitlerin yoğun kullanımı (özellikle ditiyokarbamatlar) genellikle tatlı su ekosistemlerinin kirlenmesine yol açar. Başka bir çalışmada ise japon balığının yaşam ortamı olan akvaryuma (*Carassius auratus*) 96 saat boyunca pestisit eklenmiş ve balığın solungaçlarında ki protein sentez miktarlarında ki değişimler araştırılmıştır. 96

saat boyunca pestisite maruz kalan balıkların solungaçlarında ki protein sentez miktarları artmıştır. Bu sonuçlar, pestisite maruz kalan balıklarda serbest radikallerin işlevlerini yerine getiremediğini ortaya koymuştur. Yani pestisitler balıklarda oksidatif strese yol açar ve akvaryum balıklarının solungaçlarında protein ile ilişkili enzim aktivitesini artırır.

I. Kubrak(2012)

Bir başka çalışmada yine japon balığının (*Carassius auratus*), yaşam ortamına pestisit grubu olan insektisit eklenmiş ve beyin, kas dokularında ki AChE aktiviteleri incelenmiştir. Ortama eklenen insektisit dokularda ki AChE aktivitesini azaltmıştır.

C. Wang (2009)

Gökkuşluğu balıkları kimyasal kirlenmeye maruz kaldıklarında bağışıklık sistemleri etkilenmektedir. Bir başka çalışmada da gökkuşluğu balıklarında ortamda ki herbisit varlığından dolayı meydana gelen AChE aktivitesinde görülen değişimler araştırılmıştır. Bu çalışmada gökkuşluğu balıklarında, herbisitlerin aktif maddesi olan pendimetalinin in vivo etkileri araştırılmıştır. Araştırmada onar tane balıktan oluşan toplam üç grup oluşturulmuştur. Önce balıklara on beş gün madde konmamış akvaryumlarda ortama alıştırmıştır. Daha sonra yirmi sekiz gün boyunca farklı konsantrasyonlarda pendimetalin verilmiştir. (Birinci gruba 100 µg/L, ikinci gruba 200 µg/L, üçüncü gruba 300 µg/L olmak üzere.). Daha sonra akyuvar hücre sayımı, diferansiyel lökosit sayımı, hücre ölüm oranı ve fagositoz aktivitesi ölçülmüştür. Bunun sonucunda, alternatif tamamlayıcı olan hemotolik aktivitesi, lizozom konsantrasyonu ve stres parametresi analiz edilmiştir. Pendimetalinin konsantrasyonu arttıkça buna doğru orantılı olarak balıklarda meydana gelen bağışıklık sisteminde ki düşüşlerde artmıştır. Sonuç olarak balıkların yaşam ortamı olan akvaryuma eklenen pendimetalinin konsantrasyonu AChE aktivitesini daha önceye göre düşürmüştür (M. Darion 2012).

Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzerlik göstermektedir. Bizimde araştırmamızda onar tane balıktan oluşan toplam üç grup oluşturulmuş ve buldukları akvaryum ortamına farklı dozlarda 2,4-D herbisit eklenmiştir. Yukarıdaki çalışmanın tersine eklenen herbisit konsantrasyonu AChE aktivitesini daha önceye göre arttırmıştır. Bu artışın nedeni ise; ağır metaller AChE enziminin aktif merkezindeki serine kovalent bağlara bağlanmışlardır ve (doğrudan ve fonksiyonel sülfhidril gruplara

bağlanmışlardır) enzimde konformasyonel değişikliklere neden olmuşlardır. Böylece enzimin düzgün çalışmasına engel olarak aktivitesini arttırmışlardır.

Yukarıda sözü edilen çalışmalarda çeşitli dokularda gözlenen farklılıklar uygulanan kimyasala, kimyasalın dozuna ve canlı türüne bağlı olarak farklılık göstermiştir. Çalışmalarda bizim çalışmamıza paralel olarak çeşitli pestisitler, balıkların karaciğerinde ve solungaçlarında toksik etkiye ve dokularında histopatolojik değişikliklere neden olmuştur.

Tek tür kullanılarak yapılan çalışmalar, ekolojik toksikoloji konusunda fikir edinmek için yeterli değildir. Tek türe göre düzenlenmiş sistemler komminite ve ekosistem seviyesinde interaksiyonların ölçülmesi için uygun olmazlar. Birden fazla türü aynı ortamda bulundurarak yapılan çalışmalar henüz gelişme evresindedir. Bu gibi etkiler laboratuvarında mikrokosm denilen düzenekler ile ölçülebilir. Mikrokosm doğal ekosistemdeki bütün süreçlerin modeli olarak düzenlenmiş yapay bir ekosistemdir. Mikrokosmlar gerçek ekosistemler kadar karmaşık olmazlar ve genellikle en basit besin zinciri göz önüne bulundurularak, Birkaç tür seçilerek boyutları sınırlı tutulmaktadır. Sucul mikrikosmların düzenlenmesinde daha önce tek tür ile yapılan akut toksisite test sistemlerine benzer düzenekler oluşturulur ve bu şekilde kirletici maddenin kaderi, taşınım, av-avcı ilişkileri ve davranış ile ilgili bilgiler toplanır. Türler arasında etkileşimlerin karmaşıklığı bu tip testlerin rutin olarak kullanılmasını zorlaştırmaktadır. Örneğin bir av-avcı tür kompozisyonu ile yapılan çalışma çok yararlı sonuçlar sağlayabilir. Bununla beraber, üç veya daha fazla tür ile yapılan çalışmalarla bile arazi koşullarını taklit etmek mümkün olmamaktadır.

Davranışın bir ölçüm parametresi olarak testlerde kullanılması çok yaygın değildir. Balıkların ve diğer sucul canlıların davranış tepkileri henüz çok iyi bilinmemekte ve dolayısıyla toksik maddelerin subletal etkilerini de bu yolla açıklamak zor olmaktadır. Öte yandan, görünür herhangi bir fizyolojik zarara neden olmayan toksik bir madde konsantrasyonları popülasyonları etkilemektedir. Örneğin Ohio deresinin (ABD) sularında yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu elde edilen değerler arazide test edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, çeşitli seviyede bakır ile kirletilmiş dere suları içine alınan balıklar laboratuvarında emniyetli konsantrasyonda bakır içeren akvaryumlarda yumurta bırakmışlardır. Arazide farklı bir durum görülmüştür. Aynı

konsantrasyonda bakır bulunan sulardaki balıklar yumurtalarını bırakmamakta, derenin daha aşağı kısımlarına doğru göç etmektedirler. Ancak önlerine bir bariyer konulduğunda zorunlu olarak yumurta bırakmaktadırlar. Bu da gösteriyor ki, sakınma davranışı balıklarda çeşitli streslere karşı oluşturulan en hassas göstergedir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Yaklaşık olarak 41 çeşit subletal toksisite amaçlı biyokimyasal ve fizyolojik ölçüm çeşidi vardır. Ancak, toksik maddeye gösterilen tepki hayvan için zararlı mıdır? Ya da ekolojik olarak önemi var mıdır? Sorularının yanıtlanması gerekmektedir. Bu sorulara kesin ve açık bir yanıt vermek oldukça zordur. O nedenle lokal toksisiteyi savunan bilim adamları “ölüme neden olan toksisite açık şekilde önemlidir, fakat en iyi balık fizyolojisi bile % 10'luk hematokrik azalmasının populasyon üzerinde istenmeyen bir etki yapıp yapmayacağı söylenemez” demektedirler. Ancak ölümlerle sonuçlanan bir denemenin ekolojik olarak önemi yoktur. Ekolojik olarak önemli olan ölümden önce zararlı etkiyi belirlemektir.

2,4-Diklorofenoksiasetik asitin *Xiphophorus hellerii*'de solungaç ve karaciğer dokularında farklı subletal dozların etkisine maruz bırakılmıştır. Solungaçlarında ve karaciğerlerinde AChE spesifik aktivitesi ve protein aktivitesi belirlenmiştir ve artışlar grafiklerde gösterilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular,

— 2,4-Diklorofenoksiasetik asitin *X. hellerii*'nin solungaç ve karaciğer dokularında protein ve AChE enzim aktivitelerine etkileri ile ilgili yeni bilgiler sağlanması açısından biyokimyasal toksikoloji alanında yapılan çalışmalara katkı sağlayacaktır.

— Çevre kirliliği çalışmalarında birçok değişkenin birlikte incelenmesinin doğal ortamlardaki kirliliğin değerlendirilmesinde yararlı sonuçlar verdiğini göstermiştir.

— Bulgular ülkemizde ve yurt dışında çevre koruma çalışmalarının kirlilik izleme programlarında ve ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılabilecektir.

—Balıklarda enzim çalışmaları çok azdır. Aynı zamanda kimyasal kirleticilerin, balık enzimlerine etkileri üzerine yapılan araştırmalar oldukça azdır. Bu araştırma balıklara etki eden herbisitler konusundaki eksiklikleri de gidermektedir.

KAYNAKLAR/REFERENCES

- Alırız, S., Türkoğlu, V., 2000. *İnci Kefalinden (Chalcalburnus tarichi P.1811) Asetilkolinesteraz Enziminin (EC 3.1.1.7) Afinite Kromatografisi ile Saflaştırılması* (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Bilimleri Enst., Van.
- Ali, A., Al-Ogaily, M., Al-Asgah, N.A., and Groop, J., 2003. Effect of Sublethal Concentrations of Copper on the Growth Performance of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19: 183-188.,
- Atamanalp, M., Yanık, T., 2001. Pestisitlerin Cyprinidae'lere Toksik Etkileri. *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi, Cilt. 18*, Sayı. 3-4:555-563. Atamanalp, M., Yanık, T., 2003. Alterations in Hematological Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Mancozeb. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 27:1213-1217.
- Bervoets, L., Campenhout, K.V., Reynders; H., Knapen, D., Covaci, A., and Blust, R., 2009. Bioaccumulation of Micropollutants and Biomarker Responses in Caged Carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 720-728.
- Chandra, S., Ram, R. N., Singh, I. J., 2003. Testicular Recrudescence and Recovery Response in Common Carp, *Cyprinus carpio* After Long-Term Exposure to Carbamate Pesticide. *J. Ecophysiol. Occup. Health*, 3:15-36. Chandra, S., Ram, R. N., Singh, I. J., 2004. First Ovarian Maturity and Recovery Response in Common Carp, *Cyprinus carpio* After Exposure to Carbofuran. *J. Environ. Biol.*, 25:239-249.
- Demir, H., Türkoğlu, V., 2005. Effects of Neostigmine Methylsulfate on Enzyme Activity of Acetylcholinesterase in Rat Serum, Plazma, Muscle and Liver *İn Vivo*. *Scand. J. Lab. Anim. Sci. No:1 Vol. 32*. 24-30.
- De La Torre, F. R., Salibian, A. and Ferrari, L., 2000. Biomarkers Assessment in Juvenile *Cyprinus Carpio* Exposed to Waterborne Cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 277-282. De La Torre, F. R., Salibian, A. and Ferrari, L., 2002. Freshwater Pollution Biomarker Response of Brain Acetylcholinesterase activity in Two Fish Species. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 131: 271-280.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andes, V. And Featherstone, R. M., 1961. A New Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.

- Das, B. K., Mukherjee, S. C., 2000. A Histopathological Study of Carp (*Labeo rohita*) Exposed to Hexachlorocyclohexane. *Veterinarski Arhiv*, 70, (4):169-180.
- Dutta, H. M., Maxwell, L. B., 2003. Histological Examination of Sublethal Effects of Diazinon on Ovary of Bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Environmental Pollution*, 121:95-102.
- D. Rosenberg Bullying Prevention. WGPS. Ilana , Ph.D. January 2012.
- Gluszczak L.; Dos Santos Miron D.; Moraes B. S.; Simoes R. R.; Schetinger M. R.; Morsch V. M.; Loro V. L.: ” Acute effects of Glyphosate Herbicide on Metabolic and Enzymatic Parameters of Silver Catfish (*Rhamdia quelen*)”, *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 146 (2007) 519-524.
- Govindappa, T., Govardhan, L., Jyoth, P. S., Veerabhadrapa, P., 1987. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase Isozymes From the Latex of *Synadenium Grantii* hook, ‘f. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. Vol. 24: 209-217.
- Güloğlu, Ö. F., Türkoğlu, V., Çelik, İ., 2006. Purification and Characterization of Acetylcholinesterase from Sheep Liver and Inhibition by some Poinkillers. *Asian Journal of Chemistry Vol. 13 No:2* 1097-1103.
- Edwards, F., Tchounwou, P. B., 2005. Environmental Toxicology and Health Effects Associated with Metyhl Parathion Exposure-A Scientific Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2, (3), 430-441.
- Egemen, Ö., 2005. *Su Kalitesi*. V. Baskı, Ege Üniversitesi Yayınları, Su Ürünleri Fakültesi Yayın No: 14, Bornova-İzmir. 150.
- Egemen, Ö., Canyurt, M.A., 1996. Pestisidlerin Akuatik Ortamdaki Etkileri. *Hayvancılık’96 Ulusal Kongresi*, 18-20 Eylül 1996, Cilt.1, Bildiriler, İzmir. 616-621.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M. L. M., Araujo, M. E. M., 2006. The In Vitro Screening for Acetylcholinesterase Inhibition and Antioxidant Activity of Medicinal Plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology* 108: 31-37.
- John, P. J., 2007. Alteration of Certain Blood Parameters of Freshwater Teleost *Mystus vittatus* After Chronic Exposure to Metasystox and Sevin. *Fish Physiol Biochem*, 33:15-20.
- Nachmansohn, D., 1952. *In Modern Trends in Physicology, Biochemistry*. Academic Pres, New York. 229.
- Nachmansohn, D., Lededer, E., 1939. Chemical, Molecular Basis of Nerve Activity. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 21: 797.

Literature for Luiza Wilges Kist. See also "L ... Source: Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP. 2012 Mar.

Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A., 1944a. Hydrolyze of the Butrylcholine in the Serum Cholinesterase. *Science*, 100: 454. Nachmansohn, D., Rothenberg, M.A., 1944b. Hydrolyze of the Butrylcholine in the Red Cell Enzyme. *JBC*, 158: 653.

Nino, J., Hernandez J. A., Correa, Y. M., Mosquera O. M., 2006. In Vitro Inhibition of Acetylcholinesterase by Crude Plant Extracts from Colombian Flora. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 101 (7), 783-785.

Orhan, I., Şener, B., Choudhary, M. I., Khalid, A., 2004. Acetylcholinesterase and Butrylcholinesterase Inhibitory Activity of Same Turkish medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.*, 91: 57-60.

Parvez S.; Raisuddin S.: "Effects of Paraquat on the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch): Non-Enzymatic Antioxidants as Biomarkers of Exposure", *Arch. Environ. Contam.Toxicol.* 50 (2006) 392-397.

Perkins, E. J., Schlenk, D., 2000. In Vivo Acetylcholinesterase Inhibition Metabolism and Toxicokinetics of Aldicarb in Channel Catfish Role of Biotransformation in Acute Toxicity. *Toxicological Sciences* 53: 308-315.

P. Raghu, B.E. Kumara Swamy, T.Madhusudana Reddy, B.N. Chandrashekar, and K.Reddaiah Bioelectrochemistry, 83, 19-24, (2012) (Impact Factor: 3.759).

Rahman, M. F., Mahboob, M., Grover, P., 2004. In vitro Acetylcholinesterase Inhibition by Novel OP Compounds in Various Tissues of The Fish *Channa punctatus*. *Bull.Environ. Contam. Toxicol.* 72: 38-44.

Rhee, I. K., Appels, N., Luijendijk, T., Irth, H., Verpoorte, R., 2003. Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity in Plant Extracts Using a Fluorimetric Flow Assay. *Phytochemical Analysis* 14: 145-149.

Rodriguez-Fuentes, R., Gold-Bouchot, G., 2000. Environmental Monitoring Using Acetylcholinesterase Inhibition In Vitro. A Case Study in twu Mexican Lagoons. *Marine Environmental Research*, 50: 357-360

Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Sanchez, M., Ferrando, M.D, Andreu-Moliner, E., 2000. Alterations on AChE Activity of the Fish *Anguilla anguilla* as Response to

Herbicide-Contaminated Water. *Environmental Research, Section B, Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46:57-63.

Sayed I.; Parvez S.; Pandey S.; Bin-Hafeez B.; Haque; Raisuddin S.: "Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Freshwater Fish, *Channa punctatus* Bloch", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56 (2003) 295-301.

Sprague, J.B., 1990. Aquatic Toxicology. *Methods for Fish Biology* (Eds: Schreck, C.B., and Moyle, P.B.) American Fisheries Society Bethesda, Maryland. 491-528.

Wheelock, C. E., Eder, K. J., Werner, I., Huang, H., Jones, P. D., Brammell, B. F., Elskus, A. A., Hammock, B. D., 2005. Individual Variability in Esterase Activity and CYP1A Levels in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Exposed to Esfenvalerate and Chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology*, 74:172-192.

Tao, S., Liu, C., Dawson, R., Cao, J. and LI, B., 1999. Uptake of Particulate Lead via the Gills of Fish (*Carassius auratus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37: 352-357.

Yıldırım, E., 2000. *Tarımsal Zararlılarla Mücadele Yöntemleri ve Kullanılan İlaçlar*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 219, Erzurum. 344.

Yıldırım, M. Z., Benli, A. Ç. K., Selvi, M., Özkul, A., Erkoç, F., Koçak, O., 2006. Acute Toxicity, Behavioral Changes, and Histopathological Effects of Deltamethrin on Tissues (Gills, Liver, Brain, Spleen, Kidney, Muscle, Skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fingerlings. *Environ. Toxicol.*, 21, (6):614-620.