

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DELTAMETRİN'İN VAN BALIĞI (*Alburnus tarichi*) PRİMER HEPATOSİT
KÜLTÜRÜNDE SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF HASARININ
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI
DANIŞMAN: Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DELTAMETRİN'İN VAN BALIĞI (*Alburnus tarichi* Guldenstädt, 1814) PRİMER
HEPATOSİT KÜLTÜRÜNDE SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF
HASARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından FYL-2018-7607 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ danışmanlığında, Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI tarafından sunulan “Deltametrin'in Van balığı (*Alburnus tarichi*) Primer Hepatosit Kültüründe Sitotoksik, Genotoksik ve Oksidatif Hasarının Belirlenmesi” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 12/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy~~ ~~çokluğu~~ ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güler ÜNAL

İmza:

Üye: Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ

İmza:

Üye: Dr.Öğr. Üyesi Necati ÖZOK

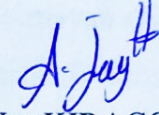
İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.07.2019 tarih ve 2019/39-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI

ÖZET

DELTAMETRİN'İN VAN BALIĞI (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814) PRİMER HEPATOSİT KÜLTÜRÜNDE SİTOTOKSİK, GENOTOKSİK VE OKSİDATİF HASARININ BELİRLENMESİ

KIRAÇÇAKALI, Ayşe Nur
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ
Temmuz 2019, 39 sayfa

Deltametrin dünya çapında popüler olan ve yaygın olarak kullanılan bir piretroit türüdür. Kimyasal, böceklerle mücadele için kullanılsa da hedef olmayan diğer canlılar üzerinde de etkileri vardır. Bu canlı gruplarından biri de balıklardır. Deltametrin, Van Gölü havzasında tarım, hayvancılık ve evsel alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmamızda, Deltametrin'in Van balığı (*Alburnus tarichi*, Güldenstädt, 1814) primer hepatosit kültürü üzerinde sitotoksik, genotoksik ve oksidatif hasarın belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, Van balığı primer hepatosit kültüründe deltametrinin farklı konsantrasyonlarının toksik etkileri karaciğer enzimleri (Aspartat aminotransferaz (AST) ve Alanin aminotransferaz (ALT), total antioksidan durumu (TAS), total oksidan durumu (TOS), lipid peroksidasyon (MDA) ve DNA hasarı (8-OHdG) parametreleri kullanılarak belirlendi.

Deltametrin, doza ve zamana bağlı olarak AST ve ALT seviyelerinde artışa neden olmuştur. TAS ve TOS seviyeleri ise sadece 24. saat sonunda artış göstermiş 48. saat sonunda bir fark bulunamamıştır. Deltametrinin MDA seviyesi üzerinde bir etki göstermezken, 8-OHdG seviyesinin arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuç olarak, deltametrinin yüksek dozlarının (1 ve 10 μM) Van balığı primer hepatosit kültüründe toksik etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Deltametrin, Karaciğer, Primer hepatosit kültürü, Van balığı



ABSTRACT

DETERMINATION OF CYTOTOXIC, GENOTOXIC AND OXIDATIVE DAMAGE IN PRIMARY HEPATOCYTE CULTURE OF DELTAMETHRIN VAN FISH (*Alburnus tarichi*)

KIRAÇÇAKALI, Ayşe Nur
MSc. Thesis, Department of Biology
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ
July 2019, 39 pages

Deltamethrin is a popular and widely used pyrethroids in worldwide. Although chemical is used to combat insects, it has effects on other non-target organisms. One of these living groups is fish. Deltamethrin is extensively used in agriculture, animal husbandry and domestic areas in Lake Van basin. The aim of this study was to determine the cytotoxic, genotoxic and oxidative damage of deltametrine on primary hepatocyte culture of Van fish (*Alburnus tarichi*). In this study, toxic effects of different concentrations of deltamethrin in primary hepatocyte culture of Van fish were investigated by liver enzymes Aspartase aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT)), total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), lipid peroxidation (MDA) and DNA damage (8-OHdG).

Deltamethrin caused an increase in AST and ALT levels depending on the dose and time. TAS and TOS levels increased at the end of the 24th hour and there was no difference at the end of the 48th hour. Deltamethrin did not show an effect on MDA level but increased 8-OHdG ($p < 0.05$). In conclusion, it can be said that high doses of deltamethrin (1 and 10 μM) have toxic effect on primary hepatocyte culture of Van fish.

Keywords: Deltametrin, Liver, Primer hepatocete culture, Van fish



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmamda, maddi-maneviher konuda desteğini esirgemeyen, engin bilgisiyle beni aydınlatan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam sırasında yardımcı olan Biyolog Zehra ALKAN'a ve laboratuardaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman maddi ve manevi her konuda desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan kıymetli aileme özellikle babam Halil KIRAÇÇAKALI ve annem Necibe KIRAÇÇAKALI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmaya, FYL-2018-7607 no'lu proje ile maddi destek sağlayan Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederim.

2019

Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
3. MATERYAL ve YÖNTEM	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Çalışma materyali	13
3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	14
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Hücre kaplarının poly-L-lysine ile kaplanması	15
3.2.2. Hepatosit izolasyonu	15
3.2.3. Hücre kültürü.....	16
3.2.4. Hücre ekstraksiyonu	16
3.2.5. Malondialdehid (MDA) tayini.....	17
3.2.6. Total oksidan (TOS) tayini.....	17
3.2.7. Total antioksidan (TAS) tayini.....	17
3.2.8. 8-Hidroksi deoksiguanosinin belirlenmesi	18
3.2.9 İstatistiksel analiz	18
4. BULGULAR	19
4.1. Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü	19
4.2. Aspartat Aminotransferaz Seviyeleri (AST)	22
4.3. Alanin Aminotransferaz Seviyeleri (ALT).....	23
4.4. Total Antioksidan Seviyeleri (TAS).....	24
4.5. Total Oksidan Seviyeleri (TOS).....	25
4.7. 8-Hidroksideoksiguanozin Seviyelerinin Belirlenmesi (8-OHdG)	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	29

KAYNAKLAR.....	33
ÖZ GEÇMİŞ.....	39



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki AST seviyeleri.....	22
Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki ALT seviyeleri.....	23
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki TAS seviyeleri.....	24
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki TOS seviyeleri.....	25
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki MDA seviyeleri.....	26
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki 8-OHdG seviyeleri.....	27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pestisitlerin ekosistem içerisindeki döngüsü.....	4
Şekil 2.2. Deltametrinin molekül formülü.....	7
Şekil 2.3. Karaciğerin histolojik görünümü	11
Şekil 3.1. Karasu çayı.....	13
Şekil 3.2. Van Balığı genel görünümü	14
Şekil 4.1. İzolasyondan sonra hepatositlerin görünümü (20 X)	19
Şekil 4.2. İzolasyondan 24 saat sonra hepatositlerin görünümü (20 X).....	20
Şekil 4.3. İzolasyondan 48 saat sonra hepatositlerin görünümü (20X).....	20
Şekil 4.4. Deltametrin (1µM) uygulamasından 48 saat sonra hepatositlerin görünümü (20X).....	21
Şekil 4.5. Deltametrin (10µM) uygulamasından 48 saat sonra hepatositlerin Görünümü (20X).....	21
Şekil 4.6. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe AST seviyeleri.....	22
Şekil 4.7. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe ALT seviyeleri	23
Şekil 4.8. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe TAS seviyeleri.....	24
Şekil 4.9. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe TOS seviyeleri.....	25
Şekil 4.10. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe MDA seviyeleri	26
Şekil 4.11. Deltametrin uygulanan Van Balığı primer hepatosit kültüründe DNA hasarı	27



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
‰	Binde
cm ³	Santimetre küp
dk	Dakika
gr	Gram
L	Litre
mEq	Miliekivalent
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molarite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrad derece
sa	Saat
UV	UltraViole
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklama
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
ALT	Alanin aminotransferaz

Kısaltmalar	Açıklama
--------------------	-----------------

AST	Aspartat aminotransferaz
BTH	Butil hidroksi toluen
CaCl₂	Kalsiyumklorid
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen daimin tetra asetik asit
GPx	Gulutasyon peroksidaz
GST	Gulutasyon S-transferaz
KCl	Kalsiyum klorid
KH₂PO₄	Potasyumdihidrojen fosfat
L-15	Leibovitz-15
LC50	Letal konsantrasyon
LD50	Letal doz
MgSO₄	Magnezyum sülfat
Na₂HPO₄	Disodyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hodroksit
PBS	Fosfat tuz tamponu
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit

1. GİRİŞ

Pestisitler 1950'lerde tarımda ve hastalık taşıyan canlıların kontrolünde kullanılmak üzere üretilmiştir. Pestisit terimi pest adı verilen zararlıları öldürmek için kullanılan madde anlamına gelir. Çeşitli hastalık taşıyan parazitlerin, tarım ve bitki zararlısı böceklerin, insanların ve hayvanların çevrelerindeki ve barınaklarındaki sinek, bit, pire, kene gibi uçan ve yürüyen pestlerin kontrolünde günümüzde vazgeçilmez kimyasal mücadele aracıdır. Pestisitlerin çoğunluğu, esas hedefleri olan haşerelere karşı kullanılsada, hedef olmayan diğer organizmalar için zehirleyici olabilirler (Tankut, 1997). Bu pestisitlerin kullanımı sonucunda verimliliği artırmak amaçlanmıştır. Pestisit olarak ilk kullanılan maddeler arsenik ve kükürttür (Gündüz ve Çukur, 1994). Deltametrin de bu kimyasallardan biri olup kullanımı kolay ve ucuzdur.

Deltametrin ilk defa krizantem (*Chrysanthemum morifolium*) çiçek ekstrasyonu ile elde edilen bir pestisit olup daha sonra sentetik olarak üretilen pretroit grubu bir pestisittir. Geniş spektrumlu etkisinden dolayı dünyada tarım, ziraat ve evsel alanlarda zararlı böceklere karşı yoğun olarak kullanılmaktadır.

Deltametrinin su organizmaları üzerinde büyük oranda toksik etkisi vardır ve yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. Bu etkilere genotoksitite, oksidatif stres, histopatolojik etkiler örnek verebilir. Van Gölü Havzasında özellikle tarım ve hayvancılık alanlarında yoğun olarak kullanılan deltametrinin birikimi söz konusu olabilir.

Van Gölü, Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde yer alan Van ve Bitlis il sınırları içinde bulunan volkanik set gölüdür. Van Gölü suyu tuzlu ve sodalı olup Türkiye'nin en büyük gölüdür. Göl yüksek pH (9.8), alkalinite (153 mEq l^{-1}) ve acı su (% 22) özelliğine sahiptir (Danulat ve Selçuk, 1992; Elp ve Çetinkaya, 2000). Van balığı Van Gölü'nün bu şartlarına adapte olduğundan dolayı gölde yaşayan tek omurgalı tür olmuştur ve bu bölgede endemiktir. Van Balığı bölge halkı için önemli bir geçim kaynağı olup, göl içerisindeki kirliliğin belirlenmesinde de önemli bir indikatör türüdür.

Bu çalışmada Van Gölü havzasında yoğun olarak kullanılan deltametrinin Van balığı primer hepatosit kültürü üzerindeki sitotoksik, genotoksik ve oksidatif hasar etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada kullanılan primer hepatosit kùltürü ile in vivo çalışmalarda kullanılan yüksek miktardaki balık sayısı minimum seviyeye indirilmiştir. Aynı zamanda Van balığından elde edilen primer hepatosit kùltürünün optimizasyonu gerçekteştirilerek bölgede yaygın olarak kullanılan diğer kimyasalların etkilerinin belirlenmesine de olanak sağlayacaktır.

Bu tez çalışmasında Van balığı hepatosit kùltüründe uygulanacak deltametinin karaciğer hücreleri üzerindeki toksik etkisi, balıklarda oksidatif hasarın incelenmesi gibi değişimler uygulanan kimyasalın dozuna ve uygulama süresine bağlı kalınarak araştırıldı.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Pestisitler, tarım ürünlerinin üretimi, işlenmesi, depolanması ya da pazarlanması esnasında zararlı bitki veya hayvan türlerini kontrol etmek, besin değerini düşüren böcek, kemirici, yabancı ot, mantar gibi canlı grupları üzerine yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir (Mustapha, 2008; İdris ve ark., 2012). Bu amaç için dünyada yüzyıllardır birçok değişik kimyasal formulasyona sahip madde, yılda yaklaşık 1.5-2 milyon ton civarında üretilmektedir. Üretilen bu pestisitlerin % 24'ü Amerika'da, % 45'i Avrupa'da, % 25 ise dünyanın geri kalan yerlerinde kullanılmaktadır (Meister, 1999; McKenzie, 2001; Uggini, 2010).

Pestisitler; inorganik pestisitler, sentetik organik pestisitler ve doğal yapılı olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Sarba ve Mehana, 2015). İnorganik pestisitler; arsenikli, civalı, florlu, bakırlı pestisitler olarak 4 alt gruba, sentetik organik pestisitler; klorlu, fosforlu, karbomathlı pestisitler ve sentetik piretroidler olarak dört alt gruba, doğal pestisitler ise pyrethrum, nikotin ve rotenonlar gibi çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır (Özdemir ve ark.,1999; Naeem, 2010).

Piretroid grubu pestisitlerin, fotostabilitesi, düşük konsantrasyonlarda etkililiği, kuşlar ve memelilerde daha az toksik etki bırakması gibi çeşitli avantajları olduğu için son dönemlerde daha fazla kullanılmaya başlanmıştır.

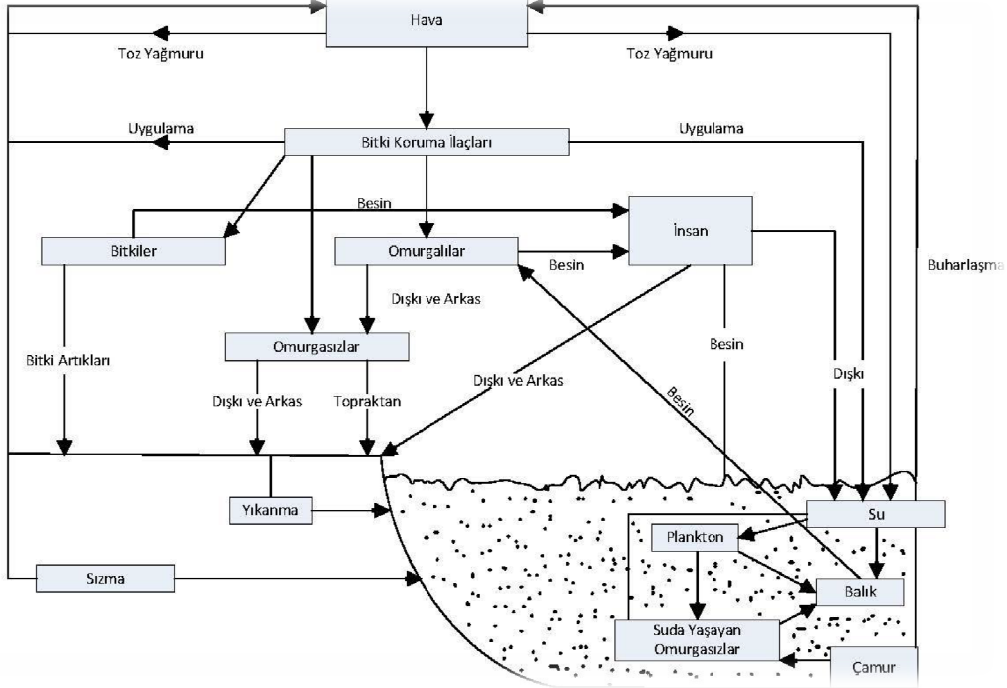
Tüketilen pestisitlerin, % 47'si herbisit, % 29'u insektisit, % 19'u fungusit, % 5'i ise diğer çeşitleridir. Pestisitler asıl amaçlarının dışında etrafa yayılarak, çevre kirliliğine ve doğal yaşamın bozulmasına, içilen suda, yenilen meyve ve sebzelerde kalıntılar bırakarak, insan sağlığı üzerinde zararlı etkiler göstermektedir (Tiryaki ve ark., 2010).

Pestisitler, göl ve nehir gibi sucul alanların kirlenmesinde, içme sularında, sulamada, balık yetiştiriciliğinde ve hayvan toplulukları üzerinde ciddi tehlikeler yaratmaktadır (Clickman ve ark.,1982).

Pestisitlere maruz kalan balıklarda, iskelet sistemi bozuklukları, hayati organların zarar görmesi ve davranış değişiklikleri gibi çeşitli etkileri görülmektedir (Singh, 1997; Omitoyin, 2006; Johal, 2007; Velmurugan, 2007).

Kullanılan pestisitler sucul ortamlara; direkt olarak suya uygulama, yüzey sularıyla taşınma, tüketilen pestisit atıklarının direk doğaya atılmasıyla, kimyasal kalıntıların olduğu bitki ve toprakların su kaynakları ile teması, kullanılan materyallerin su kaynaklarında yıkanmasıyla, uygulanan kimyasalın kanalizasyon ve lağım sularına karışmasıyla, pestisit imalat artıklarının direkt deşarjı sonucu kirlenmesini, yağmur suları, drenaj suları, yüzey akışları ve sulama sularına karışması gibi birçok farklı yolla ulaşarak kirlenmektedir. Ayrıca doğrudan suya yapılan uygulamalar sonucunda pestisitler su bitkileri veya dipteki çamurlar tarafından tutulabilmektedirler (Tuncer, 1987; Naem, 2010).

Havadan çok düşük seviyelerde uygulanan pestisitler buradan su kaynaklarına ve toprağa oradan da bitki ve hayvanlara geçerek besin zincirine ulaşabilmektedir. Kalıntı içeren bu besin maddelerinin, sucul organizmalar tarafından tüketilmesi besin zinciri yolu ile diğer su organizmaları ve nihayetinde bu zincirin son halkası olan insanlara kadar ulaşabilmekte ve kalıntı düzeyi daha yoğunlaşmış olarak ortaya çıkabilmektedir (Öztürk, 1997).



Şekil 2.1. Pestisitlerin ekosistem içerisindeki döngüsü (Sulak ve ark., 2012).

Kirleticilerin yan etkilerini tanımlamak ve tahminde bulunmak için çeşitli yöntemler denenebilir. Pestisitlerin aşırı ve bilinçsiz kullanımının önlenmesi ve özellikle canlılardaki subletal dozlarının ortaya çıkarılması (LC₅₀-LD₅₀) hedef olmayan canlılar için tehlikeyi azaltabilecek önlemlerdir. Balıklar, su kirliliği için önemli biyo-indikatör türlerdir. Su ekosisteminin ve su kalitesinin korunması, gerçekleştirilecek uygulamalarla mümkündür (Srivastava ve ark., 2016).

Suda çözünürlüğü 10 mg/L'den yüksek olan pestisitler, uygulandığı alandan sızıp doğal sulara kadar ulaşır, çözünürlüğü 10 mg/L den az olanlar ise toprakta birikebilir. Bu sızma sucul canlılar üzerinde akut veya kronik zehir etkisine neden olabilmektedir. Bu etki sonucunda canlıda; fiziksel ve morfolojik bozukluklar, üreme bozuklukları, yumurta kabuk bozuklukları ve aynı zamanda canlıda birikimiyle ekosistemde, organizmadan organizmaya geçerek miktarının artmasına ve belli seviyeden sonra toksik etki yaratmasına yol açmaktadır (Mathew ve ark., 1992; Patel ve ark., 2006; Sulak ve ark., 2012).

Pestisit kalıntıları, çeşitli yollarla sucul ortama ulaştığında en çok etkilenen canlılardan biri balıklardır. Bu kimyasalların balıklar üzerindeki etkileri farklı şekillerde görülür (Toros, 1991; Sayeed ve ark., 2003). Direkt olarak ölümlerine yol açacağı gibi yumurta bırakmalarını ve çoğalmalarını durdurarak balık popülasyonunun azalması gibi olumsuz etkilere neden olabilmektedir. Ek olarak dokularda oluşturduğu zararlarla balıkların daha hassas olmasına bundan dolayı da mevsimsel ısı değişimlerinden ve kısa süreli açlıktan oldukça yüksek oranda etkilenmelerine neden olabilirler. Bu fizyolojik ve kimyasal bozukluklar çeşitli gelişim dönemlerinde farklı etki göstermektedir. Örneğin yavru balıkların ergin balıklara göre daha hassas fizyolojik yapıları nedeniyle daha fazla etkilenmektedirler (Toros, 1991).

Pestisitlerin su içerisinde hareketliliği temelde suda eriyebilirliğine ve formülasyonuna bağlıdır. Suda eriyebilen ya da suda eriyebilecek şekilde formüle edilen pestisitler su içerisinde kısa sürede dağılırlar. Fakat toz veya granül formda bulunanlar su içerisinde askıda kalarak uzun süre aktif maddelerinin yayılmasına neden olurlar. Balıklar solungaçları vasıtasıyla su ortamından bu pestisitleri absorbe ederek ya da kirlenmiş materyallerin besin olarak tüketimi sonucu pestisite maruz kalabilir ya da zehirlenebilirler.

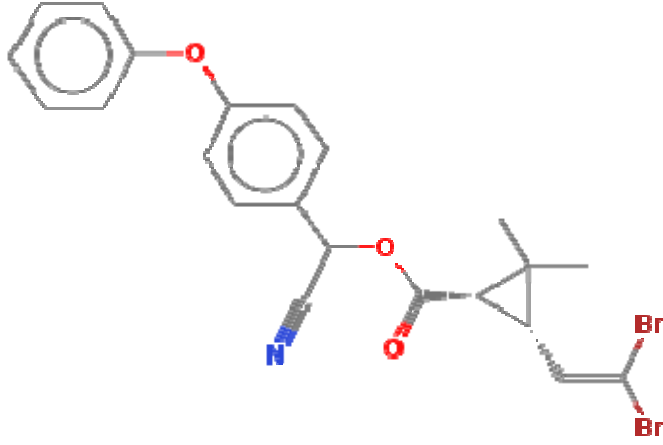
Pestisitlere maruz kalan balıklarda karaciğer, böbrek ve solungaç dokuları diğer organlara göre daha fazla etkilenir (Atmaca, 2016; Jabeen ve Chaudhry, 2016).

Pretroit grubu pestisitler memelilerde ester hidrolizi, oksidasyon ve konjugasyonla metabolize olduğunda dokularda birikmezler. Bu nedenle organizmalarda biyolojik birikimi düşüktür (Bradbury ve ark., 1989). Fakat balıklarda ve bazı sucul organizmalarda toksik etkisinin daha yoğun olduğu bilinmektedir. Lipofilik özelliklerinden dolayı solungaçlardan absorpsiyonları yüksek orandadır. Bu da balıkların pretroitlere duyarlılığını artırmaktadır (Srivastav ve ark., 1997).

Piretroid türü pestisitlerin metabolize edilmeleri kolay olduğu için çoğu hayvanda oldukça kısa bir ömre sahip olmasına rağmen balıklarda durum böyle değildir. Çünkü balıklarda piretroid grubu pestisitleri hidrolize eden enzim sistemi bulunmamaktadır (Haya, 1989; Guardiola ve ark., 2014). Yapılan karşılaştırmalı in vivo ve in vitro metabolik çalışmaları da balıkların pretroit grubu pestisitleri metabolize ederek yok etme oranlarının diğer canlılara göre daha düşük olduğunu göstermiştir (Glickman ve Lech, 1981; Glickman, 1982).

Yüksek dozlarda kullanılan pretroid grubu pestisitlerin genetik materyale etki etmesi sonucu hücresel ve yapısal bozukluklar meydana getirmektedir. Sucul canlılarda blastopor kapanmadan önce yumurta gelişimini durdurmaktadır. Yeni birey oluşumundaki bu aşamada döllenmiş embriyoda ölüm oranı oldukça fazladır. Nedeni ise embriyonun erken dönemlerinde piretroidlere karşı duyarlılığın fazla olmasından kaynaklanmaktadır (Dhawan ve Kaur, 1996).

Deltametrin, son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlanan, (s)-alfa-siyano-3-fenoksi benzil cis-(1R,2R)-3-(2,2-di bromovinil) 2 dimetil siklo propan karboksilat) formülasyonuna sahip pretroit grubu bir insektisittir. Krizantem çiçek ekstrasyonu ile elde edilen deltametrin, % 98'den fazla saflığa sahip doğal insektisit olup, saf halde güneş ışığında etkisini daha çabuk kaybettiği için 1980'lerde siyanür, brom, krom ilave edilerek ticari amaç için satılmaya başlanmıştır (Kaya ve ark., 2002).



Şekil 2.2. Deltametrinin moleküler yapısı.

Deltametrin, sineklerde öldürücü etkisi yüksek olan bir α -siyano piretroitdir. Memelilerde metabolizması ve atılımı hızlı olduğu için zehirliliği oldukça düşüktür. (Kan ve ark., 2012; Guardiola ve ark., 2014).

Deltametrinin hedef olmayan farklı canlı türleri üzerindeki toksik etkisine ilişkin çalışmalar mevcuttur. Bunlardan bazıları şöyledir; Deltametrin uygulaması amfibilere ait olan larva, erginlik öncesi ve ergin bireylerin büyüme ve gelişimi üzerine yapılan çalışmalarda büyüme oranlarının azalması ve metamorfozda gecikme gibi etkiler oluşturduğu (Marchal-Segault ve Ramade 1981; Bouhafs, 2009; Saha ve Gupta, 2011) hücresel bazda, kromozomal yapı anormallikleri, DNA-DNA çapraz bağları, DNA-protein çapraz bağları, serbest radikal oluşumu, oksidatif DNA baz hasarları, mikronukleus oluşumu gibi bir çok genotoksik sonuçlar doğurmaktadır (Arrouijal,1990; Kasprzak, 1991; Bogdanova, 2002).

Deltametrin Bataklik kurbağalarının (*Pelophylax ridibundus*) subadult bireyleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahiptir. Sitotoksik etkisi hücre membranı üzerinde morfolojik bozukluklar oluştururken, nükleus üzerinde genotoksik etki, DNA da da zincir kırıklığı hasarı şeklinde gözlemlenmiştir (Scassellati, 1994; Avcı, 2013).

Yapılan bir çalışmada, deltametrinin Benekli yılan başı balığı (*Channa punctatus*) üzerindeki oksidatif stresinin araştırıldığı çalışmada 96 saatlik LC₅₀ değerini 1.5 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada LC₅₀ değerinin yarısı 0.75 µg/L'ye balıklar 48 saat süresince maruz bırakılarak bazı enzimlerdeki değişimler

incelenmiştir. 48 saatlik tek maruz kalma böbrek ve karaciğerde çeşitli antioksidan enzimlerin ve enzimatik olmayan antioksidanların indüklenmesine neden olmuştur. Balıklarda bulunan glutatyon, tüm dokularda artmıştır. Askorbik asit ise karaciğer ve böbrekte artmış, solungaç dokusunda azalmıştır (Sayeed ve ark., 2003).

Ansari ve arkadaşlarının (2009) Benekli yılan başı balığı (*Channa punctata*) eritrositlerinde deltametrinin genotoksik etkisi ve yarattığı oksidatif stresi inceledikleri çalışmada balıklar 48 ve 72 saat süresince 3 farklı deltametrin konsantrasyonuna (0.4, 0.8, 1.2 µg/L) maruz bırakılmışlardır. Yetmişiki saat sonunda eritrositlerde loblu, çentikli ve ikili nükleus tiplerine rastlanmıştır. Antioksidan enzim ve superoksit dismutaz aktivitesinde önemli derecede azalma tespit edilmiştir.

Sivrisinek balığı (*Gambusia affinis*) na uygulanan deltametrinin sonucunda balık solungaç epitelyumunda histopatolojik değişimlerin olduğu belirlenmiştir. Deltametrinin hipertrofi, ödem ve anevrizmaya sebep olduğunu gösterilmiştir (Cengiz ve Ünlü, 2005).

Radi (1985)'nin yapmış olduğu çalışmada deltametrine maruz kalan Benekli yılan başı balığı (*Channa punctatus*) nda karaciğer ve böbrek dokularında GPx ve GST antioksidan enzimlerinin aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. GPx ve GST enzimlerinin çalışması yalnızca solungaçta tükenmiştir. Katalaz enziminin aktivitesi tüm organlarda azalmıştır.

Sharma ve Ansari'nin (2010) deltametrinin Zebra balığı (*Danio rerio*) nın üreme yeteneğine etkisini araştırdıkları çalışmada subletal doz olarak 0.016 µg/L kullanılmış ve 3 ay süresince balıklar bu doza maruz bırakılmıştır. Deney sonucunda yumurta veriminin deltametrin uygulanan grupta % 54.12 oranında azaldığını tespit etmişlerdir.

Viran ve arkadaşlarının (2003) deltametrinin Lepisteslerde (*Poecilia reticulata*) akut toksisite ve davranış değişimlerini inceledikleri çalışmada deltametrinin 48 saatlik LC₅₀ değerini 5.13 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Deltametrine maruziyet sonucundaki davranış değişimlerine ilişkin su üzerinde duramama, denge kaybı ve kuyruk üstüne düşme şeklinde farklı davranışlar gözlemlendiği bildirilmiştir.

Deltametrine maruz kalan Benekli yılan balığında (*Channa punctatus*), karaciğerde ve böbreklerde GPx ve GST seviyelerinin, reaktif oksijen türlerinin oluşturabileceği hasara karşı koruma sağlamak amacıyla yüksek olduğu bulunmuştur.

GST aktivitesindeki artış, karaciğer ve böbreklerde glutatyon içeriğindeki artış ile eşdeğer olduğu görülmüştür (Sayeed ve ark., 2003; Özok ve ark., 2018).

Yıldırım ve arkadaşlarının (2006) Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus*)'nda deltametrinin akut toksik, davranış değişimleri ve dokularda histopatolojik etkilerini araştırdıkları çalışmada 48 saatlik LC₅₀ değeri 4.85 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Lavranın gelişimi deltametrin tarafından etkilenmiş ontogenezis bozulmuştur.

Deltametrin, Sivrisinek balığı (*Gambusia affinis*) karaciğerinde hipertrofi, kupfer hücrelerinde belirgin artış, nekrozlar ve yağ dejenerasyonları ortaya çıkarmıştır (Cengiz ve Ünlü, 2005).

Golow ve Godzi (1994) Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus*) nda deltametrin için 96 saatlik LC₅₀ değerini 14.5 µg/L olarak bulunmuş ve dieldrin pestisiti ile yapılan çalışmanın sonucuyla kıyaslandığında deltametrinin dieldrine göre daha toksik olduğunu belirtmişlerdir.

Kumar ve arkadaşları (1999) deltametrinin İğneli yayın balığı (*Heteropneustes fossilis*) üzerine akut toksik etkisini ve hematolojisini inceledikleri çalışmada LC₅₀ değerini 0.52 mg/L olarak bulmuştur. Deltametrin, eritrosit sayısında önemli bir artışa neden olurken, hemoglobinin azalmasına yol açmıştır.

Svobodova ve arkadaşları (2003) juvenil Sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) hematolojik değişimler üzerinde yaptıkları çalışmada deltametrinin (96 saatlik) LC₅₀ değerini 0.058 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Kan plazmasındaki sayım sonucundahematokrit, hemoglobin ve toplam protein içeriği kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede azalma olduğu tespit edilmiştir.

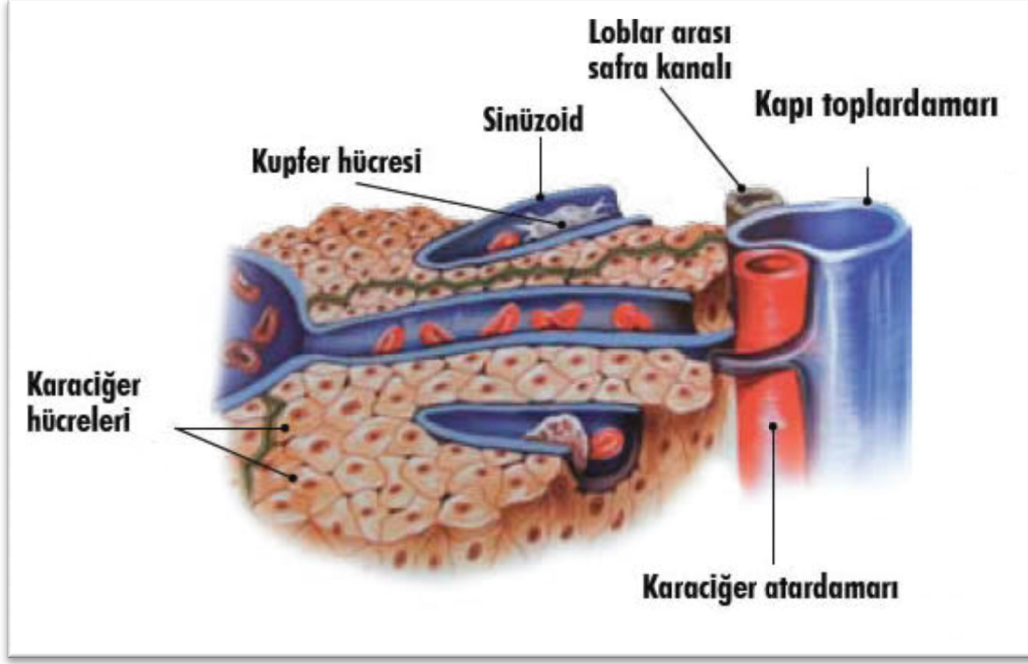
Kan ve arkadaşlarının (2012) deltametrine maruz bırakılan Nil tilapiası (*Oreochromis niloticus*) nın eritrositlerindeki mikronükleus frekansı ve solungaç, karaciğer dokusundaki histopatolojik değişimlerdeki E vitaminin rolünü araştırmışlardır. Çalışmada E vitamininin, deltametrin tarafından uyarılan genotoksisite ve histopatolojik değişiklikleri azalttığını belirtmektedirler.

Deltametrinin Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde etkisini araştırıldığı çalışmada LC₅₀ değerini 0.02 mg/L olarak ölçülmüştür. Bu değerler, balıklarda hızlı soluk alıp verme, hareketlerde yavaşlama ve dengesizlik, su yüzeyinden sıçrama gibi fizyolojik etkiler oluşturmuştur (Velisek ve ark., 2007).

Pestisitlerin balıklarda ve farklı canlı gruplarında genetik bozukluklara ve oksidatif hasara yol açtığı yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Pestisitlerin teratogenez ve mutasyonlara neden olarak büyüme geriliği oluşturduğu görülmüş ve aynı zamanda balıkların ergin dönemlerinde hayatta kalma oranlarını düşürmüştür. Vücudun farklı organlarında deformasyonlar ve gelişim anormallikleri de gözlemlenmiştir (Scassellati, 1994; Akpoilih, 2012; Obiakor ve ark., 2012). Ayrıca pestisitlerin karsinogeneze neden olduğu bulunmuştur (Dunn, 1991; Weishburger ve Williams, 1991; Adlouni, 1995; Erickson ve Larsson, 2000).

Karaciğer kimyasal maddelerin detoksifikasyonunda rol alır ve toksik bileşenlerin metabolizma ile atılmasını sağlar. Toksik maddelere maruz kalan karaciğerdeki histopatolojik ve biyokimyasal değişimler gösterdiği için bu organ iyi bir biyomarkırdır (Hinton ve Couch, 1984).

Karaciğer, sindirim sistemi ve sistemik dolaşım ile sıkı bir ilişki içinde olması nedeniyle dışarıdan sindirim yoluyla ya da ilaçlarda olduğu gibi enjeksiyon sonucu vücuda giren kimyasallara çok fazla maruz kalmaktadır. Karaciğerin temel fonksiyonu aminoasit, lipit, karbonhidrat ve vitaminleri almak, bunların fazlalarını depolamak, metabolik dönüşümü sağlamak ve bu maddeleri kan ve safra içine yaymaktır. Ayrıca dışarıdan alınan yabancı maddelerin biyotransformasyonunda temel görev üstlenmektedir (Sendensky ve Dufour, 2011).



Şekil 2.3. Karaciğerin histolojik görünümü.

Balık karaciğeri diğer omurgalı canlılardaki gibi çoğu hayati fonksiyonu düzenleyen önemli bir organdır. Ayrıca hem anabolizma hem de katabolizma olaylarında yer aldığı için balık fizyolojisinde önemli bir yere sahiptir (Brusle ve Anadon, 1996).

Van balığında karaciğer, üç loblu bir yapıdan oluşur. Bezin anterior kısmı; özafagustan sonra bağırsağın çevresini kapsayan geniş bir yapı şeklinde olup sonra loblara ayrılır. İlk lob (ventral) en uzun ve ince olan lobtur. Bağırsağın ventralinde birinci kıvrıma kadar uzar. İkinci lob (sağ lateral lob), bağırsağın sağ lateralinde bulunur. Ve ventral loba oranla daha kısadır. Üçüncü lob (sol lateral lob) ise bağırsağın sol lateralinde bulunur ve bu da ikinci loba oranla daha kısadır (Oğuz, 2002).

Dünyada sadece Van Gölü Havzasında yaşayan Van balığının boyu yaklaşık 19 cm, ortalama ağırlığı ise 80 gr civarındadır. Besinlerini planktonlar oluşturur. Ömürleri en fazla 6 ila 7 yıl civarındadır ve 3 yaşından itibaren üreme yeteneği kazanır. Üreme zamanı Nisan başından Temmuz sonuna kadardır (Ünal ve ark. 1999).

Van balığı yılın 10 ayını Van Gölünde kendine uygun sıcaklıkta geçirirken nisan başından itibaren üremek için tatlı su ağızlarına gelmeye başlar. Su sıcaklığı 13 dereceyi geçtiği zaman derelere girer. Derelerin su akımının yavaşladığı hafif çakıllı ve kumlu

bölgelerine yumurtasını bırakır ve tekrar göle döner. Yavrular ise ağustos ayı içinde göle dönerler. Gölün besince zengin kıyılarında sürüler halinde dolaşırlar.

Van balığının popülasyonu, üreme döneminde yapılan yanlış ve aşırı avcılık yüzünden tehlikeye girmiş olup nesli tükenmektedir. Van Gölü havzasında yapılan tarım sonucunda birçok pestisit kullanıldığı bilinmektedir. Her ne kadar balık popülasyonunda ki azalma aşırı avcılık ile ilişkilendirilsede, göl çevresinde kullanılan pestisitlerin buradaki canlılara olan etkisine değinilmemiştir. Deltametrin, Van Gölü havzasında tarımda, hayvancılıkta, zirai alanlarda, evsel alanlarda kullanılan pretroit türü pestisit olup kullanımı kolay ve maliyeti ucuz olduğu için daha çok tercih edilmektedir.

Bu çalışmada Van Gölü havzasında yoğun olarak kullanılan deltametrinin farklı dozlarının Van balığı primer hepatosit kültüründe oluşturduğu etkiler biyokimyasal ve morfolojik olarak belirlemeye çalışıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma materyali

Van balığı, üreme göçü sırasında Van Gölüne dökülen Karasu Çayından (Şekil 3.1.) serpmeye ağlar ile yakalandı. Yakalanan balıklar (Şekil 3.2.) oksijen bağlı taşıma kapları ile hücre kültürü laboratuvarına getirildi. Laboratuvara getirilen balıklar steril su içerisinde, anestezi (Fenoksi etanol 320 µl/L) edilinceye kadar bekletildi.



Şekil 3.1. Karasu çayı.

Bu çalışmada kullanılan balıklar için gerekli olan izinler Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan (18.04.2018 tarih ve 11057 sayı) ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Hayvan deneyleri yerel etik kurulundan (2019/6) alınmıştır.



Şekil 3.2. Van balığının genel görünümü.

3.1.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Deltametrin Bayer tarımdan satın alındı. Hücre kültüründe kullanılan, antibiyotik-antimikotik (A5955), kollojenaz (F7524), Leibowitz-15 (L1518), Poly-L-Lysine (P4707) sigma (Almanya)'dan satın alındı. Total antioksidan (TAS) ve oksidan kit (TOS) Rel assay medikal (Gaziantep, Türkiye)'den 8-Hidroksi deoksiganosine (8-OHdG) DNA hasar kiti ise Bioassay teknoloji laboratuvarından (Çin) satın alındı.

3.1.3. Kullanılan laboratuvar materyalleri

Çalışmada aşağıda belirtilen cihaz ve laboratuvar materyalleri kullanılmıştır.

- Ependorf tüpü (inoLab, Almanya)
- Falkon tüpü
- Hücre kültür kabı (Çin)
- İnkübatör (Binder, İngiltere)
- Makas, pens, bistüri
- Mikropipet (İtalya)
- Mikroskop (DM 6000 Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya)

- pH metre (inoLab, Almanya)
- Pipet ucu
- Santrifüj (precise, Amerika)
- Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya)
- Vorteks (SciLOGEX, Amerika)

3.2.Yöntem

3.2.1. Hücre kaplarının poly-L-lysine ile kaplanması

Kültür kaplarının (24 kuyucuklu kültür kabı, Greiner, Almanya) kaplanması için % 0.1'lik poly-L-Lysine (P4707, Sigma) hazırlandı. Bundan 100 µl alınarak her bir kuyucuğa eklendi ve laminar akım kabini içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Kültür kapları daha sonra 100 µl saf su ile iki defa yıkandı ve en az iki saat kurumaya bırakıldı.

3.2.2. Hepatosit izolasyonu

Balıklar fenoksi etanol (320 µl/L) ile anestezi edildikten sonra sterilizasyon için % 70'lik etanole daldırıldı. Balıklar, laminar akışlı kabin içerisinde disekte edilerek, karaciğer dokusu çıkartıldı ve oda sıcaklığında bulunan hepatosit tamponu (136.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.44, mM KH₂PO₄, 5.0 mM NaHCO₃, 0.33 mM Na₂HPO₄, 0.81 mM MgSO₄ pH:7.6.) içerisine alındı. Alınan karaciğer dokusu keskin bir bistüri yardımıyla petri içerisinde küçük parçalara ayrıldı ve hepatosit tamponu ile oda sıcaklığında muamele edildi. Bu işlem 30 dakikalık süre içerisinde birkaç kez tekrarlandı. Daha sonra doku, % 1 kollejenaz içeren hepatosit tamponu içine alındı ve 20 dakika 200 rpm'de çalkalayıcıda tutuldu. Yumuşayan doku, farklı mikropipet uçlarından geçirilerek ajite edildi ve tek kullanımlık elekten (100 µm por çaplı) geçirildi. Elek üzerinde kalan doku tekrar kollojenaz ile muamele edildi ve elekten geçirildi. İzole edilen hücreleri içeren süspansiyon 1 defa 90 Xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak üzerine 0.016 mM CaCl₂ içeren hepatosit tamponu bırakıldı ve 2 defa 3 dakika satrifüj edildi. Üçüncü yıkamadan sonra hücre süspansiyonu Leibovitz-15 (besi ortamı) içerisine alındı, besi ortamına kontaminasyonun önlenmesi

amacıyla antibiyotik-antimikotik solüsyon (10 ml/Litre) ve 5 ml NaHCO₃ eklendi ve süspanse edildi.

Hücre süspanسیونundan bir miktar alınarak trypanblue (% 4) ile boyandı, canlı ve ölü hücre ayrımı yapıldı. Yapılan kültürde eritrosit sayısının hiçbir zaman % 10'u geçmemesine dikkat edildi. İzole edilen hepatositler 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler bir gün inkibatörde bekletildi (18°C). Ertesi gün medium alınarak uygulanacak olan deltametrinin farklı dozları (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM, 10 µM) uygun hücre kültür kaplarına (24 kuyucuklu mikropalakalar) eklendi.

Belirtilen her bir doz ve kontrol grubu için 6 kuyucuk kullanıldı. Hücre kültürlerinden 24. ve 48. saatlerde hücreler alındı ve ekstrakte edildi. Deltametrinin 4 farklı konsantrasyonu (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM) kültür kaplarına alınan karaciğer hücre kültürleri üzerine eklendi.

3.2.3. Hücre kültürü

Hücre kültürüne başlamadan önce % 1'lik deltametrin stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisi farklı konsantrasyonları (0.01 µM, 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM) hazırlamak için kullanıldı.

Hepatositler izole edildikten sonra poly-L-lysine ile kaplanmış 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Farklı konsantrasyonlardaki deltametrin L-15 içinde çözüldü. Her konsantrasyona ait bir kültür oluşturuldu. Sonuçta her kuyuya 1 mL'lik medyum eklendi ve daha sonra hücre kültürleri 24 °C'de nemli ortamda inkübe edildi. Morfolojik değişiklikler ve tüm değişiklikler invert mikroskopla incelendi (Leica DM 6000), toksisitenin kültür üzerindeki etkisi her konsantrasyonda 24. ve 48. saatlerde kaydedildi ve fotoğraflandı.

3.2.4. Hücre ekstraksiyonu

Hepatosit kültürü 48 saat boyunca farklı konsantrasyonlara maruz bırakıldı. 24 ve 48 saat sonrasında hücreler tripsinize edildi. Daha sonra tüplere alınan hücreler 5 dakika 2000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant atılarak, hücre pelleti 1 ml hepatosit tamponu (PBS) ile yıkandı. Hücre homojenize edildi ve hücre pelleti tekrar 2000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant toplandı.

3.2.5. Malondialdehid (MDA) tayini

Hücre ekstraktları inkübe edildikten sonra, numuneden 200 µl alındı ve tüpe bırakıldı. Üzerine 800 µl fosfat tamponu, 25 µl Butil hidroksi toluen (BHT) solüsyonu ve 500 µl % 30 Tiyobarbitürik asit (TCA) eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 30 dakika boyunca buzdolabında (-80°C) tutuldu. Daha sonra 15 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantdan 1 ml alınarak diğer tüplere aktarıldı. Daha sonrasüpernatantın üzerine 75 µl Etilen daimin tetra asetik asit (EDTA) ve 250 µl Tiyobarbitürik asit (TBA) eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırıldı ve 15 dakika boyunca sıcak su banyosunda (90 °C) tutuldu. Daha sonra oda sıcaklığına getirildi ve absorbansı 532 nmdalga boyunda spektrofotometre ile okundu.

3.2.6. Total oksidan (TOS) tayini

Çalışılacak örnekler -80 °C soğutucudan, buz üzerinde dışarı çıkartıldı. Örnekler çözündükten sonra 45 µl alınarak 300 µl ayıraç 1 ile karıştırıldı. 30 sn sonra 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Daha sonra ayıraç 2 den 15 µl alınıp iyice karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 530 nm dalga boyunda tekrar ölçüldü. Elde edilen değerler aşağıdaki eşitliğe (Eş. 3.1) göre hesaplandı.

$$A_2 - A_1 = \Delta \text{Abs standart/örnek absorbansı} \quad (3.1)$$

$$\text{Sonuç} = \frac{\Delta \text{Abs Örnek}}{\Delta \text{Abs Standart}} \times 10$$

3.2.7. Total antioksidan (TAS) tayini

Çalışılacak örnek çözündükten sonra 18 µl alınıp kit içerisindeki ayıraç 1'den 300 µl alınarak karıştırıldı ve 30 sn sonra 530 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Bu karışımın üzerine ayıraç 2'den 45 µl eklenerek vorteks yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra 37 °C'de su banyosunda 5 dakika inkübe edildi ve 660 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Elde edilen değerler kit prosedüründe yer alan denklemler ile hesaplandı. Elde edilen değerler aşağıdaki eşitliğe (Eş. 3.2) göre hesaplandı.

$$A2-A1 = \Delta\text{Abs standart/örnek}/\text{H}_2\text{O absorbansı}$$

$$\text{Sonuç} = \frac{[\text{sonuç} = 20 - \Delta\text{Abs örnek}]}{[\Delta - \Delta\text{Abs}20 - \Delta\text{Abs standart}]} \quad (3.2)$$

3.2.8. 8-Hidroksi deoksiguanosinin belirlenmesi

Çalışma sonunda DNA hasarları hazır ticari ELISA kiti ile ölçüldü. 24 ve 48 saat sonunda alınan örnekler ekstrakte edildi ve Ticari Kit Prosedürüne göre değerlendirildi. Son olarak örneklere ait absorbans değerleri spektrofotometrede 450 nm’de ölçüldü. Kit içerisindeki standartlardan elde edilen grafik yardımıyla değerler hesaplandı.

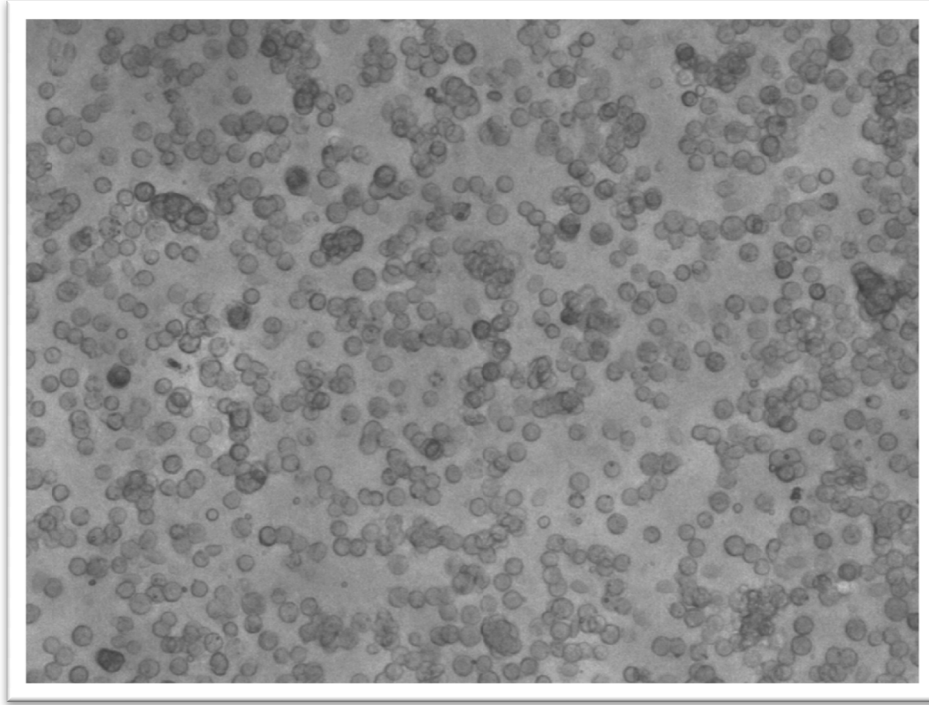
3.2.9 İstatistiksel analiz

Analizler sonucunda elde edilen değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak ifade edildi. Kontrol ve deltametrinin farklı konsantrasyonları uygulanan grupların çoklu karşılaştırmaları için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve arkasından Duncan testi yapılarak farklılığın derecesi ortaya konuldu. Değerler arasındaki fark $p < 0.05$ ’e göre yapıldı.

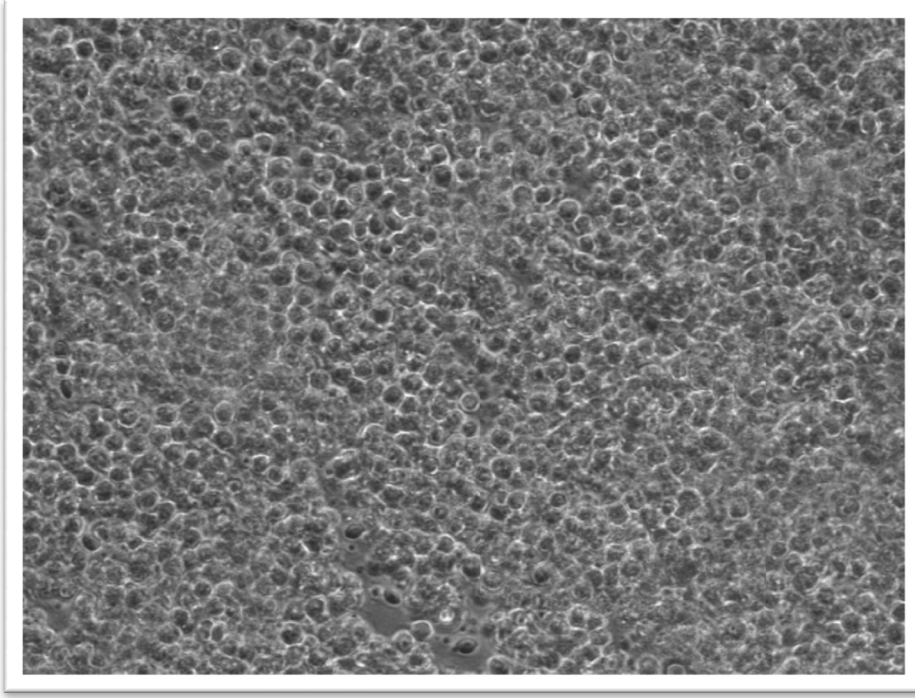
4. BULGULAR

4.1. Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü

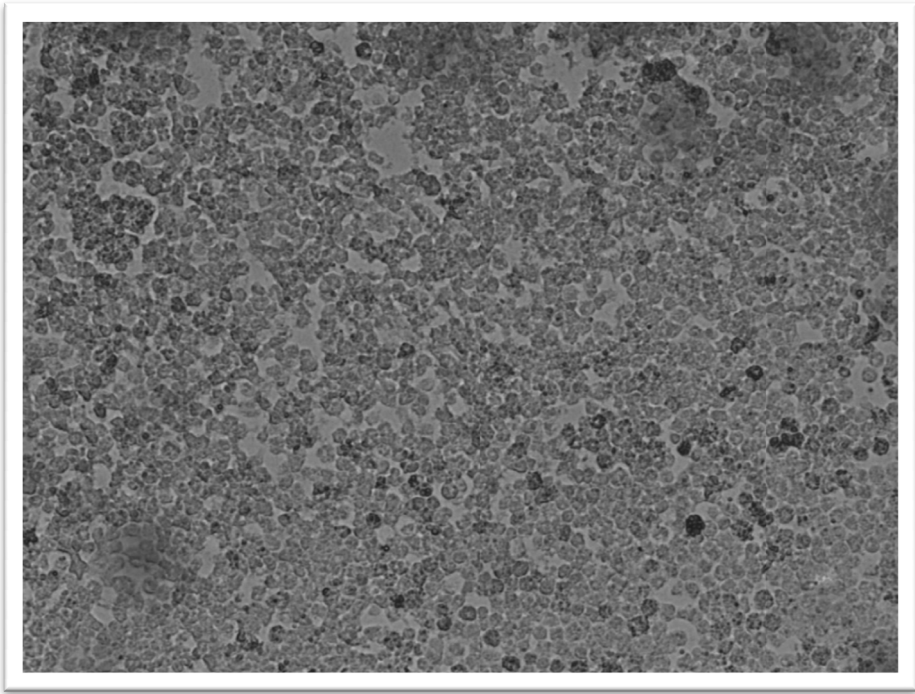
Hepatosit izolasyonu sonucunda elde edilen hücre canlılık seviyesi % 85'den fazlaydı. Kültürdeki eritrosit seviyesi ise diğer hücrelerle kıyaslandığında % 10'u aşmadığı belirlendi. İzolasyondan hemen sonra hücreler yuvarlak şekilli ve tek tek görünmekteydi (Şekil 4.1.). Kuyucuklara bırakılan hücrelerin saatler sonra taban kısmına yapıştığı ölü hücrelerin ve hücre artıklarının medium içerisinde askıda kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2.). 48 saat sonrasında hücrelerin hücre kordonu şeklinde bir görünüm aldığı ve daha sonraki zamanlarda ise yassılaştığı belirlendi (Şekil 4.3.). Deltametinin yüksek konsantrasyonlarının hücrelerde ölümlere neden olduğu ve hücresel düzenlenmesini bozduğu mikroskopik incelemeler sonunda belirlendi.



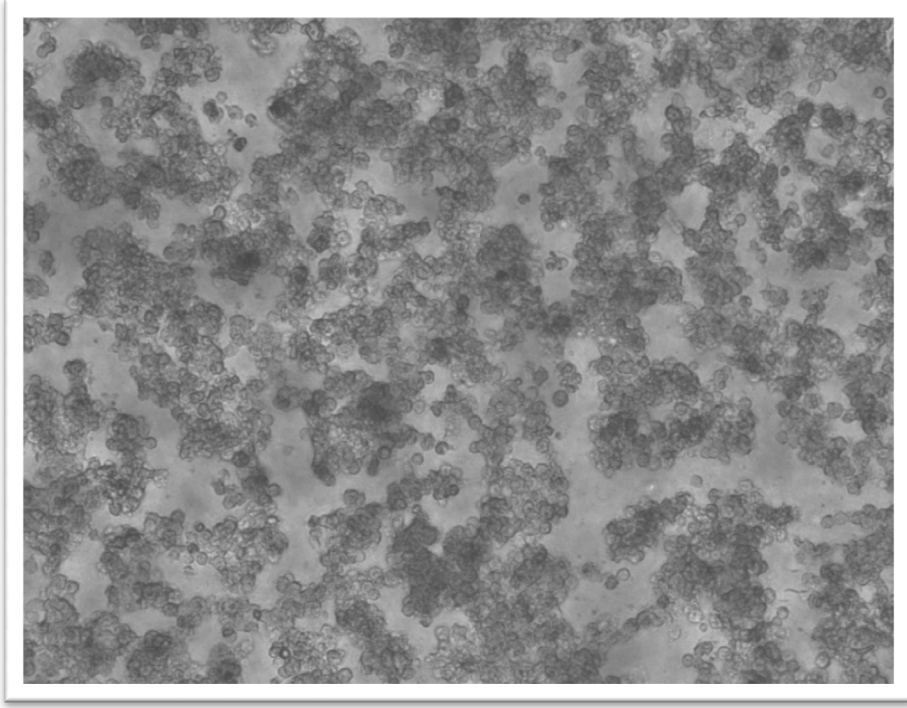
Şekil 4.1. İzolasyondan sonra hepatositlerin görünümü (20 X).



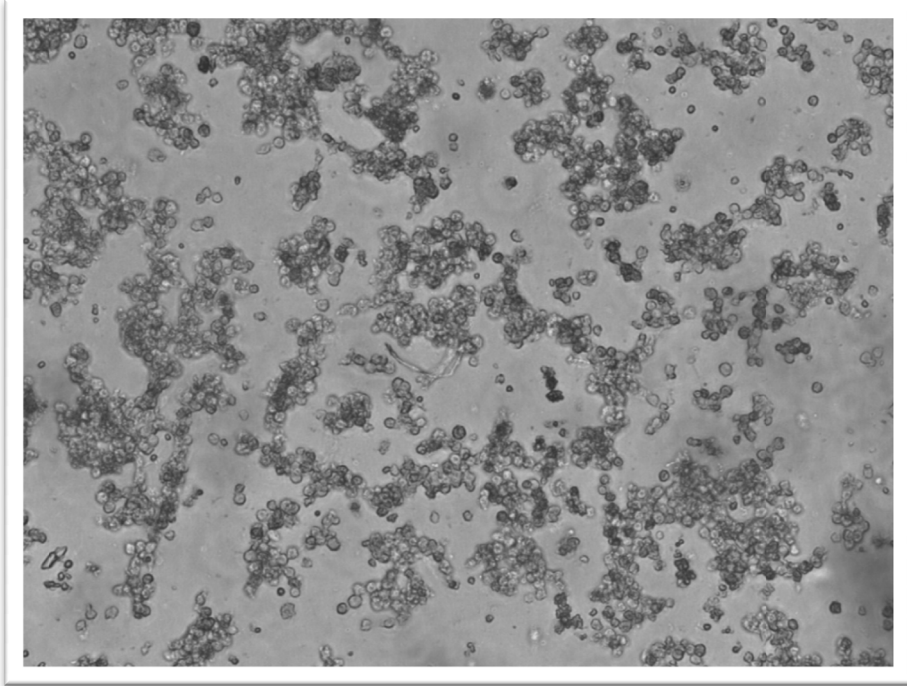
Şekil 4.2. İzolasyondan 24 saat sonra hepatositlerin görünümü (20 X).



Şekil 4.3. İzolasyondan 48 saat sonra hepatositlerin görünümü (20X).



Şekil 4.4. Deltametrin ($1\mu\text{M}$) uygulamasından 48 saat sonra hepatositlerin görünümü (20X).



Şekil 4.5. Deltametrin ($10\mu\text{M}$) uygulamasından 48 saat sonra hepatositlerin görünümü (20X).

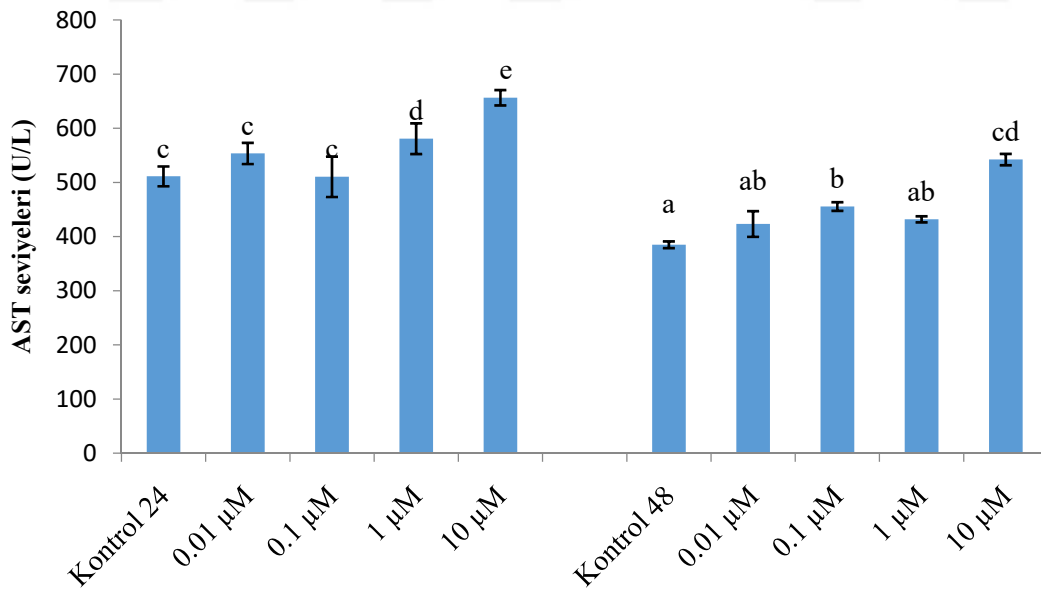
4.2. Aspartat Aminotransferaz Seviyeleri (AST)

AST seviyesi deltametrin uygulaması sonucunda 24 ve 48 saatlerde artış gösterdi ($p<0,05$) (Çizelge 4.1, Şekil 4.6). Bu artış deltametrinin $1 \mu\text{M}$ ve $10 \mu\text{M}$ de istatistiksel olarak önemliyken diğer dozlarda önemsiz bulundu.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki AST seviyeleri.

	N	24	48
Kontrol	6	115.667±2.642 ^c	208.667±7.915 ^a
0.01μM	6	129.833±6.886 ^{cd}	222.500±4.773 ^{ab}
0.1 μM	16	130.600±3.140 ^c	272833±7.956 ^b
1 μM	6	132.800±2.853 ^d	289.167±8.807 ^{ab}
10 μM	6	140.200±3.527 ^e	345.500±9.563 ^{cd}

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir ($p<0.05$). n:örnek sayısı.



Şekil 4.6. Deltametrin uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe AST seviyeleri.

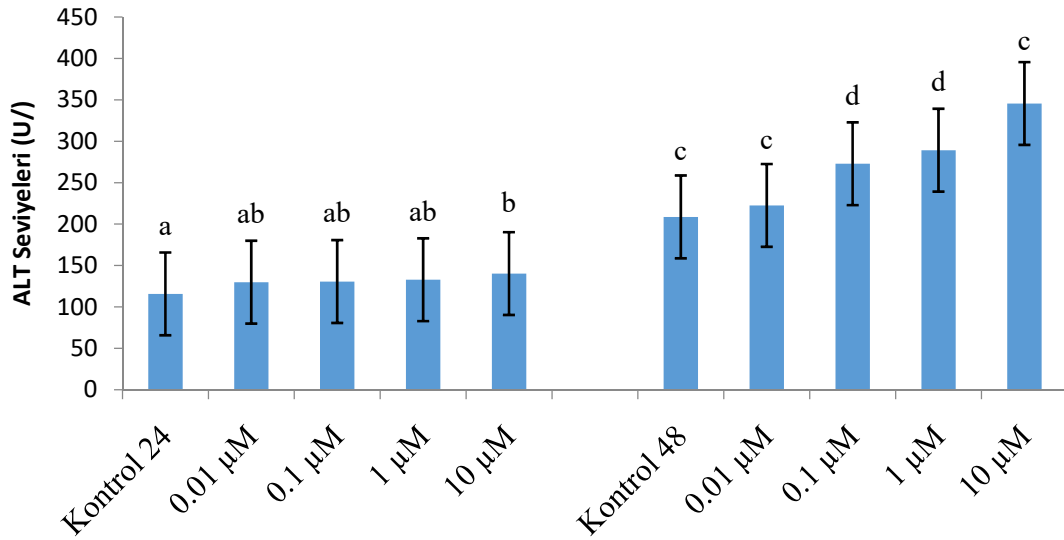
4.3. Alanin Aminotransferaz Seviyeleri (ALT)

ALT seviyeleri deltametrin uygulanan gruplarda kontrol grubuyla kıyaslandığında 24. Saatte sadece 10 μM 'lık dozda istatistiksel olarak önemli bir artış belirlenmemiştir. ALT seviyeleri 48. Saatin sonunda deltametrinin 0.1, 1 ve 10 μM 'lık dozlarında artış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4,2 Şekil 4,7).

Çizelge 4.2. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki ALT seviyeleri.

	N	24	48
Kontrol	6	511.300±18.331 ^a	385.000±6.218 ^c
0.01μM	6	553.600±19.590 ^{ab}	423.317±23.726 ^c
0.1 μM	6	510.520±37.356 ^{ab}	455.550±7.986 ^d
1 μM	6	580.920±28.393 ^{ab}	432.000±5.644 ^d
10 μM	6	656.520±14.126 ^b	542.300±10.510 ^e

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir ($p<0,05$). n:örnek sayısı.



Şekil 4.7. Deltametrin uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe ALT seviyeleri.

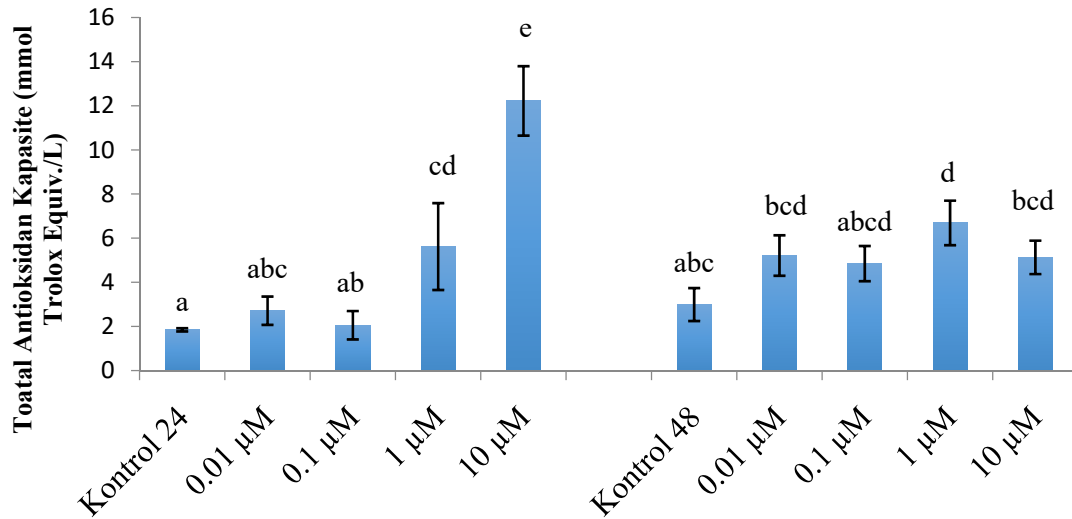
4.4. Total Antioksidan Seviyeleri (TAS)

Van balığı primer hepatosit kültüründe uygulanan farklı konsantrasyondaki deltametrin total antioksidan kapasitesinde artışa neden olmuştur. Uygulamanın gerek 24 gerekse 48 saat sonrasında uygulanan kimyasalın 10 μM ve 1 μM dozlar TAS seviyesinde artışa neden olmuştur ($p < 0,05$) (Şekil 4.8).

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki TAS seviyeleri.

	N	24	48
Kontrol	6	1.85000±0.071880 ^a	2.99667±0.746622 ^{abc}
0.01μM	6	2.71667±0.642089 ^{abc}	5.21667±0.914847 ^{bcd}
0.1 μM	6	2.05800±0.644022 ^{ab}	4.85000±0.799062 ^{abcd}
1 μM	6	5.62400±1.967121 ^{cd}	6.69500±1.008906 ^d
10 μM	6	12.22333±1.573535 ^e	5.13333±0.757041 ^{bcd}

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir ($p < 0,05$).n:örnek sayısı.



Şekil 4.8. Deltametrin uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe TAS seviyeleri grafiği.

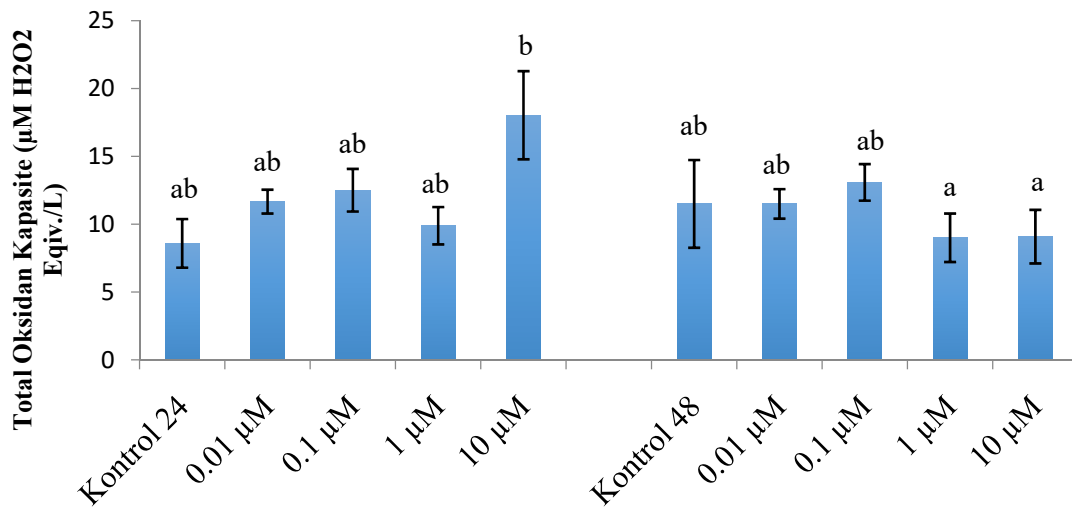
4.5. Total Oksidan Seviyeleri (TOS)

TOS seviyelerininde TAS seviyelerinde olduğu gibi 24. saatte deltametrinin yüksek dozlarında artış gösterdiği belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.9.). Fakat 48. Saatin sonunda hem 1 μM hem de 10 μM 'lık dozlarda azalma gözlemlendi. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdi.

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki TOS seviyeleri.

	n	24	48
Kontrol	6	8.59000±1.011259 ^{ab}	11.5000±3.232646 ^{ab}
0.01μM	6	11.6666±0.881917 ^{ab}	11.5000±1.087811 ^{ab}
0.1 μM	6	12.5080±1.571898 ^{ab}	13.0833±1.345713 ^{ab}
1 μM	6	9.89000±1.375190 ^{ab}	9.00000±1.788854 ^a
10 μM	6	18.0350±2.774145 ^b	9.08666±1.97493 ^a

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir ($p<0,05$).n:örnek sayısı.



Şekil 4.9. Deltametrin uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe TOS seviyeleri.

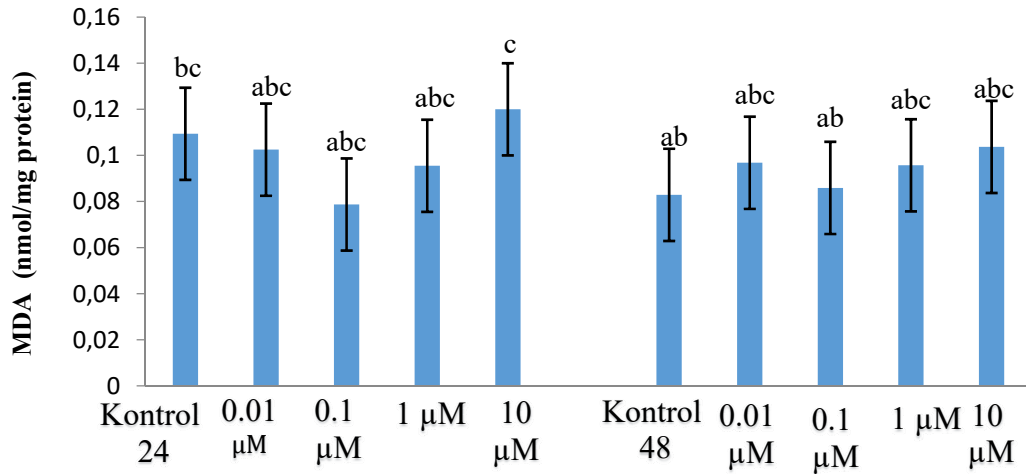
4.6. Malondialdehit Seviyeleri (MDA)

MDA seviyeleri deltametrin uygulanan dozlarına bağlı olarak artış göstermiştir. Fakat bu artışlar istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlendi (Şekil 4.10).

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda deltametrin uygulanan kültürdeki MDA seviyeleri

	N	24	48
Kontrol	6	0.10940±0.00165 ^{bc}	0.08288±0.005471 ^{ab}
0.01µM	6	0.10255±0.00935 ^{abc}	0.09527±0.004974 ^{abc}
0.1 µM	6	0.07860±0.006743 ^{abc}	0.08592±0.006610 ^{ab}
1 µM	6	0.06986±0.002536 ^{abc}	0.04658±0.002019 ^{abc}
10 µM	6	0.09862±0.006917 ^c	0.08022±0.014096 ^{abc}

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir (p<0,05).n:örnek sayısı.



Şekil 4.10. Deltametrin uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe MDA seviyeleri grafiği

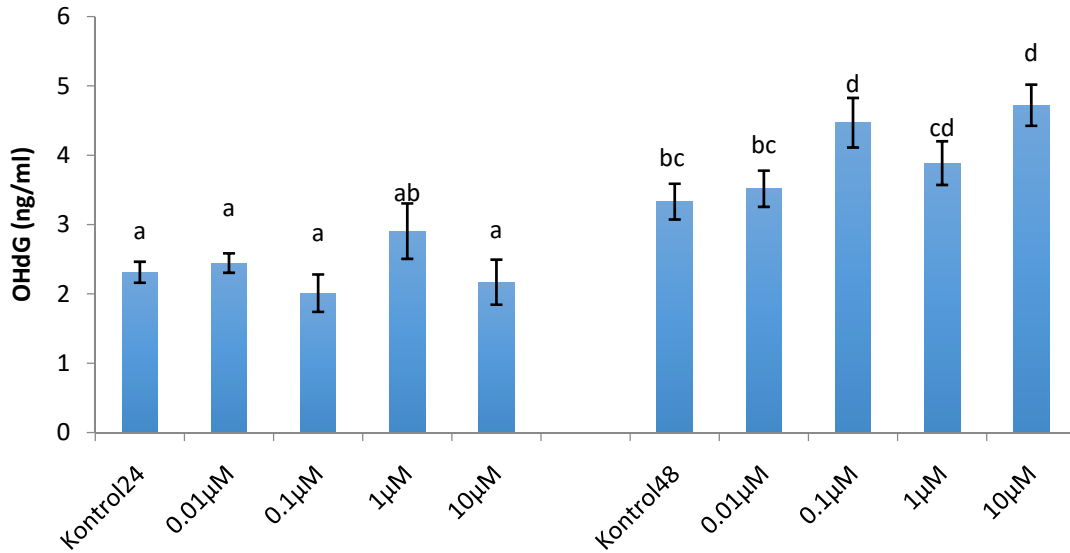
4.7. 8-Hidroksideoksiguanozin Seviyelerinin Belirlenmesi (8-OHdG)

DNA hasar seviyeleri incelendiğinde 24. saatin sonunda herhangi bir farklılığın olmadığı, 48. saatin sonunda ise 10 μM ve 0.1 μM dozlarda istatistiksel olarak bir artışın meydana geldiği belirlendi (Şekil 4.11).

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda deltametrim uygulanan kültürdeki 8-OHdG seviyeleri.

	n	24	48
Kontrol	6	27.4967±0.67943 ^{ab}	25.8627±0.41691 ^{ab}
0.01μM	6	26.33 ±0.65114 ^a	26.23 ±1.36621 ^{bc}
0.1 μM	6	25.5359±0.46013 ^{ab}	28.1503±0.76099 ^c
1 μM	6	27.6438±1.5382 ^{ab}	30.6667±2.78828 ^c
10 μM	6	26.5163±1.4562 ^{ab}	30.6046±2.65289 ^d

Değerler ortalama±ortalamanın standart hatası olarak verildi. Farklı harfler istatistiksel farklılığı gösterir (p<0,05). n:örnek sayısı.



Şekil 4.11. Deltametrim uygulanan Van balığı primer hepatosit kültüründe DNA hasarı.



5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Deltametrin, organoklorinli ve organofosfatlı pestisitlerle karşılaştırıldığında çevresel birikimin ve toksik etkilerin az olmasından dolayı yoğun olarak kullanılan bir pestisittir. Dünyada olduğu gibi Van Gölü havzasında da hem tarım ve hayvancılık, hem de evsel alanlardaki zararlı böceklerin kontrol altına alınmasında, özellikle sivrisineklerle mücadelede kullanılan pretroid grubu bir pestisittir.

Van balığı primer hepatosit kültürünün yapıldığı bu çalışmada, deltametrinin farklı konsantrasyonlarının (0.01 μM , 0.1 μM , 1 μM ve 10 μM) toksik etkileri karaciğer enzimleri aspartaz aminotransferaz (AST) ve alanin aminotransferaz (ALT)), total antioksidan durumu (TAS), total oksidan durumu (TOS), lipid peroksidasyon (MDA) ve DNA hasarı (8-OHdG) parametreleri kullanılarak belirlenmeye çalışıldı.

Yapılan çalışmada primer hepatosit kültürü başarılı bir şekilde uygulanmıştır. İzolasyon sonucunda elde edilen bulgular daha önceki çalışmalara paralellik gösterdi (Baksi ve Frazier 1990; Pesonen ve Andersson, 1997; Oğuz ve Ünal, 2015). Mikroskopik incelemeler sonucunda deltametrinin yüksek dozlarında (1-10 μM) hücresel düzenlenmenin bozulduğu, hücrelerin öldüğü ve petri tabanından kalkarak askıda kaldığı gözlemlendi. Diğer düşük dozlarda ise hücresel yapının korunduğu gözlemlendi. Benzer olarak Van balığı primer hepatosit kültürüne uygulanan bazı kimyasallarında benzer etkiler yaptığı belirtilmiştir (Oğuz ve Ünal, 2011). Karşılaştırmalı in vivo ve in vitro çalışmaları, pretroid grubu pestisitlerin balıklar tarafından metabolize edilme oranlarının çok düşük olduğunu ortaya koymuştur (Glickman ve Lech, 1981; Glickman ve ark., 1982).

Deltametrinin canlılarda pek çok organ ve sistem üzerine toksik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. Bu çalışmalarda, genital sistem (Marettova ve ark., 2017), sinir sistemi (Guo ve ark., 2018), böbrek (Ncir ve ark., 2018) ve karaciğer (Amin ve Hashem, 2012) üzerine etkileri belirlenmiştir. Amin ve Hashem (2012), Yayın balığını kullanarak yaptıkları bir çalışmada deltametrinin çok düşük konsantrasyonlarında dahi (0.75 μg) yüksek derecede toksik etkiye neden olduğunu göstermişlerdir. Buna ek olarak, deltametrinin toksik etkisinin Yayın balığı karaciğerinde, böbrek ve solungaçlara oranla daha fazla olduğunu bildirilmiştir.

Önemli karaciğer enzimlerinden olan AST ve ALT primer hepatosit kültüründe toksitenin belirlenmesinde sıkça kullanılan parametrelerdendir. Deltametrinin, AST ve ALT seviyesini arttırdığı yapılan in vivo çalışmalarla belirlenmiştir (Amin ve Hashem, 2012; Abdelkhalek ve ark., 2015). Yapılan bu çalışmalara paralel olarak deltametrin farklı konsantrasyonlarının uygulandığı bu çalışmada, aspartat aminotransferaz seviyesinde 24 ve 48 saatlerde artış gözlemlenmiştir. AST seviyesindeki bu artış 1 µM ve 10 µM dozlarda istatistiksel olarak önemliyken ($p < 0,05$) diğer dozlarda önemsizdir. Alanin aminotransferaz (ALT) seviyesi deltametrin uygulanan gruplarda kontrol grubuyla kıyaslandığında 24 saatte sadece 10 µM'lık dozda istatistiksel olarak artış göstermiştir. ALT seviyeleri 48 saatin sonunda deltametrinin 0.1, 1 ve 10 µM'lık dozlarında artış göstermiştir. Böylece deltametrinin yüksek konsantrasyonlarının (1-10 µM) Van balığı hepatositleri için toksik olduğu söylenebilir.

Van balığı primer hepatosit kültüründe uygulanan deltametrinin 1 µM ve 10 µM dozları total antioksidan kapasitesinde artışa neden olmuştur. Bu artışın kimyasalın etkisine karşı bir savunma olarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Total oksidan seviyesi de (TOS), TAS seviyelerinde olduğu gibi 24. saatte deltametrinin yüksek dozlarında artış gösterdiği belirlendi. Fakat 48. Saatin sonunda 1 µM ve 10 µM'lık dozlarda bir azalma gözlemlendi. Fakat bu farklılıklar istatistiksel olarak önemsizdi. Radi ve ark, (1985) Deltametrin uygulanan balıkların karaciğerinde antioksidan enzimlerden olan GPx ve GST aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Glutatyon peroksidaz (GST) Glutatyon S-transferaz (GPx) seviyesinde bir artış gözlemlenmiştir (Sayeed ve ark., 2003).

Oksidatif stres ve DNA hasarı, toksitenin belirlenmesinde kullanılan diğer önemli parametrelerdendir. Van balığı hepatosit kültürünün yapıldığı bu çalışmada lipid peroksidasyon ürünü olan MDA seviyesinde deltametrinin uygulanan dozlarına bağlı olarak artış göstermiş, fakat bu artış istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. Gerek 24, gerekse 48 saat sonunda deltametrinin, MDA üzerinde önemli bir etki göstermediği belirlendi. Buna benzer olarak deltametrin kullanılarak yapılan Sazan balığı primer hepatosit hücre kültüründe, MDA seviyesinde sadece uygulanan en yüksek dozda (0.8 µg/L) artış gözlemlenirken, 4. Gün sonunda ise herhangi bir değişiklik belirlenmemiştir (Ensibi ve ark., 2013). Bu çalışma ile kıyaslandığında deltametrin uygulanarak yapılan

hücre kültüründe, MDA seviyesinde herhangi bir etki göstermemesinin nedeni uygulama süresinin kısa, uygulanan dozlarının düşük olmasıdır.

DNA hasar seviyeleri incelendiğinde 24. saatin sonunda herhangi bir fark bulunamamış yalnız 48. saatin sonunda 10 μM ve 0.1 μM dozlarda istatistiksel bir artışın meydana geldiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, deltametinin Van balığı primer hepatosit kültüründe oksidatif strese neden olduğu, belirlenmiştir. Van Gölü havzasında birikimi muhtemel bu kimyasalın *in vivo* uygulamaları yapılarak diğer organ ve sistemler hakkında etkileri de net olarak ortaya konmalıdır.





KAYNAKLAR

- Abdelkhalek, N. K., Ghazy, E. W., Abdel-Daim, M. M., 2015. Pharmacodynamic interaction of spirulin *aplatensis* and deltamethrin in fresh water fish Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: impact on lipid peroxidation and oxidative stress. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(4): 3023-3031
- Abdollahi, M., Bahreini-Moghadam, A., Emmami, B., Fooladian, F., Zafariet, K., 2003. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular salivary comparative, *Biochemistry and Physiology*, **135**: 331-336.
- Akpoilih, U., 2012. Fish ecogenotoxicology: an emerging science, an emerging tool for environmental monitoring and risk assessment. *Global Journal Bioscience and Biotechnology*, **1**: 141-151.
- Amin, K. A., Hashem, K. S., 2012. Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of cat fish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *BMC veterinary research*, **8**(1): 45.
- Ansari, R. A., Kaur, M., Ahmad, F., Rahman, S., Rashid, H., Islam, F., Raisuddin, S., 2009. Genotoxic and oxidative stress-inducing effects of deltamethrin in the erythrocytes of a freshwater biomarker fish species, *Channa punctata*, Bloch, *Environmental Toxicology*, **24**: 429-436.
- Arrouijal, F. Z., Hildebrand, H., Vopfi, D., 1990. Genotoxic activity of nickel subsulphide α -Ni₃S₂. *Mutagenesis* **5**: 583-589.
- Atmaca, E., 2016. Pestisitlerin su canlıları üzerine etkileri. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences- Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, **2**: 50-57.
- Avcı, E., 2013. *Deltametrin (Pestisit; İnsektisit)'in Pelophylax Ridibundus (Amphibia: Anura) Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Eritrosit Mikronucleus Testi İle Belirlenmesi* (Master's thesis). Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Afyon Kocatepe Üniversitesi.
- Baksi, S. M., Frazier, J. M., 1990. Isolated fish hepatocytes model systems for toxicology research. *Aquatic Toxicology*, **16**(4): 229-256.
- Bogdanova, A.Y., Gassmann, M., Niknmaa, M., 2002. Copper ion redox state is critical for its effects on ion transport pathways and methaemoglobin formation in trout erythrocytes. *Chemical Biology Interaction*, **139**: 43-59.
- Bouhafs, N., Berrebbah, H., Devaux, A., Rouabhi, R., Djebbar, M. R., 2009. Micronucleus induction in erythrocytes of tadpole *Rana saharica* (Green Frog of North Africa) exposed to artesa 330 EC. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, **1**(1): 07-12.
- Bradbury, A., Steven, P., Joel, R. C., 1989. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY. **12**: 133-177.
- Brusick, D. J., 1987. Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, **189**(1): 1-6.

- Bruslé, J., Anadon, G., 1996. The structure and function of fish Liver, *Fish Morphology*, **76**: 545-551
- Cengiz, E. I., Ünlü, E., 2002. Histopathological changes in the gills of mosquitofish, *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **68**(2): 290-296.
- Cengiz, U., Ipek, E., 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosqui to fish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **21**: 3246-253.
- Clickman, A. H., Lech, J. J., 1982. Differential toxicity of transper-methrin in rainbow trout and mice. II. Role of target organ sensitivity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **66**: 162-171
- Danulat, E., Selcuk, B., 1992. Life history and environmental conditions of theanadromous *Chalcalburnus tarichi* (*Cyprinidae*) in the highly alkaline Lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. *Archive fur Hydrobiologie*, **126**(1): 105-125.
- Dhawan, K., Kaur, K., 1996. Toxic effects of synthetic pyrethroids on *Cyprinus carpio* eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**: 999-1002.
- Dunn, B. P., 1991. Carcinogen adducts as an indicator for the public health risks of consuming carcinogen-exposed fish and shell fish. *Environmental Health Perspecive*. **90**: 111-116.
- El Adlouni, C., Tremblay, J., Walsh, P., Lagueux, J., Bureau, J., Laliberte, D., Keith, G., Nadeau, D., Poirier, G. G., 1995. Comparative study of DNA adducts levels in white sucker fish (*Catostomus commersoni*) from the basin of the St. Lawrence river (Canada). *Molecular and Cell Biochemistry* **148**: 133-138.
- Elp, M., Çetinkaya, O., 2000. İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*)'nin üreme biyolojisi üzerine bir araştırma. *IV. Doğu Anadolu Su Ürünleri Sempozyumu*, Erzurum, Turkey, **68**: 51-66.
- Ensibi, C., Perez-Lopez, M., Rodríguez, F. S., Miguez-Santiyan, M. P., Yahya, M. D., Hernández-Moreno, D., 2013. Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **36**(2): 384-391.
- Erickson, B., Larsson, A., 2000. DNA adducts in perch (*Perca fluviatilis*) living in coastal water polluted with bleached pulp mill effluents. *Ecotoxicol and Environmental safety*. **46**: 167-173.
- Glickman, A. H., Lech, J. J., 1981. Hydrolysis of permethrin, a pyrethroid insecticide, by rainbow trout and mouse tissues in vitro a comparative study. *Toxicology Appl. Pharmacology* **66**: 162-171.
- Glickman, A. H., Weitman, S. D., Lech, J. J., 1982. Differential toxicity of trans-permethrin to rainbow trout and mice. role of biotransformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**: 153-161.
- Golow, A.A., Godzi, T.A., 1994. Acute toxicity of deltametrin and dieldrin to oreochromis niloticus (LIN), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **52**: 351-54.
- Guardiola, F. A., González-Párraga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., Esteban, M. A., 2014. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status,

- metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, **36**(1): 120-129.
- Guler, Ç., Çobanoğlu, Z., 1997. Pestisitler, *Çevre Sağlığı Kaynak Dizisi*, İlköz Matbaası, Ankara, **52**: 173.
- Guo, J., Xu, J., Zhang, J., An, L., 2018. Alteration of mice cerebral cortex development after prenatal exposure to cypermethrin and deltamethrin. *Toxicology Letters*, **287**: 1-9.
- Gündüz, T., Çukur, A., 1994. Hazar Gölü ağır metal kirlenmesi. *Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinin Su kaynakları ve Sorunları Sempozyumu*, Erzurum.
- Haya, K., 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environment Toxicology Chemical*, **(8)**: 381-391.
- Heath, A. G., 1987. Water pollution. *Fish Physiology*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Hinton, D. E., John, A. C., 1984. Pathobiological measures of marine pollution effects technical report. Maryland university sea grant program. college Park mdtech. rep. md. univ. sea grant program. 7-32 invitro and in vivo studies of allium sativum extract against deltamethrin-induced oxidative stress in rats brain and kidney. *Archives of Physiology and Biochemistry*, **124**(3): 207-217.
- Idris, N. M., Gnanasammandhan, M. K., Zhang, J., Ho, P. C., Mahendran, R., Zhang, Y., 2012. In vivo photodynamic therapy using upconversion nanoparticles as remote-controlled nanotransducers. *Nature Medicine*, **18**(10): 1580.
- Jabeen, F., Chaudhry, A. S., 2016. Nutritional composition of seven commercially important freshwater fish species and the use of cluster analysis as a tool for their classification. *Journal of Animal Plant Sciences*, **26**(1): 282-290.
- Johal, M. S., Sharma, M. L. Ravneet., 2007. Impact of low dose of organophosphate, monocrotophos on the epithelial cells of gills of *Cyprinus carpio* communis Linn. - SEM study. *Journal of Environmental Biology* **28**: 663-667.
- Kan, Y., Cengiz, E. İ., Uğurlu, P., Yanar, M., 2012. The protective role of vitamin E on gill and liver tissue histopathology and micronucleus frequencies in peripheral erythrocytes of oreochromis niloticus exposed to deltamethrin, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **34**: 170-179.
- Kasprzak, K. S., 1991. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chemical Research in Toxicology*, **4**: 604-615.
- Kumar, S., Latta, S., Gopal, K., 1999. Deltamethrin induced physiological changes in freshwater cat fish heteropneustes fossilis. *Environmental Contamination and Toxicology*, **62**: 254-258.
- Ma, T.H., 1981. Tredescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening, *Environmental Health Perspective*, **37**: 85-90.
- Marchal-Segault, D., Ramade, F., 1981. The effects of lindane, an insecticide, on hatching and post embryonic development of *Xenopus laevis* (Daudin) anuran amphibian. *Environmental Research*, **24**: 250-258.
- Marettova, E., Marett, M., Legáth, J., 2017. Effect of pyrethroids on female genital system. review. *Animal Reproduction Science*. **184**: 132-138.
- Mathew, G., Vijayalaxmi, M., Abdul, R., 1992. Sperm shape abnormalities caused by methyl parathion. *Mutat Research*, **280**: 169-173.

- McKenzie, W., 2001. Agrochemical service: the world market in 2000. *Annual Review of the Crop Protection Association*, Peterborough: Crop Protection Association.
- Meister, R. E., 1999. Farm chemicals hand book. Willough by, oh, usa: *Meister Publishing Company*. 65:56-78.
- Mustapha, M. K., 2008. Assessment of the water quality of Oyun Reservoir, Offa, Nigeria, using selected physico-chemical parameters. *Turkish Journal Fish Aquatic Sciences*, 8: 309-319.
- Naeem, M., Salam, A., Tahir, S. S., Rauf, N., 2010. Assessment of the essential element and toxic heavy metals in hatchery reared *Oncorhynchus mykiss*. *International Journal Agriculture Biology*, 12: 935-938.
- Ncir, M., Saoudi, M., Sellami, H., Rahmouni, F., Lahyani, A., Ayadi, F., Allagui, M. S., 2018. In vitro and in vivo studies of *Allium sativum* extract against deltamethrin-induced oxidative stress in rats brain and kidney. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(3): 207-217.
- Obiako, M. O., Okonkwo, J. C., Nnabu, C. D., 2012. Ecogenotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as in situ aquatic pollution biomarker: a review. *Journal Animal Science Adv*, 2: 123-133.
- Oğuz, A. R., Ünal, G., 2011. The effects of 17 α -ethynylestradiol, 4-nonylphenol and phenol red on vitellogenin synthesis in juvenile *Chalcalburnus tarichi* primary hepatocyte culture. *Toxicology and Industrial Health*, 27(4): 379-384.
- Oğuz, A. R., Ünal, G., 2012. The Effects of 17 β -Estradiol on Vitellogenin, Total Protein, Histochemical, and Some Morphological Indices on *Chalcalburnus tarichi*. *Journal of the Institute of Natural Applied Science*, 17: 84-94.
- Oğuz, A. R., Ünal, G., Kaptaner, B., 2015. Determination of plasma vitellogenin levels and localization of vitellogenin in liver of Lake Van pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 14(3): 546-554.
- Omitoyin, B. O., Ajani, E. K., Adesina, B. T., Okuagu, C. N., 2006. Toxicity of lindane (gamma hexachloro-cyclohexane) to *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *World Journal Zoology*, 1: 57-63.
- Ören, P., 2009. *Malathion'un Oreochromis Niloticus'ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri* (Master thesis), Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji A.B.D., Adana 301.
- Özdemir, M. H., Çekin, N., Gülmen, M. K., 1999. The importance of autopsy in medical malpractice claims. *Ankara Patoloji Bülteni*, 16: 43-5.
- Özok, N., A. R. Oğuz, E. Kankaya, and A. Ç. Yeltekin 2018. Hemato-biochemical responses of Van fish (*Alburnus tarichi* Guldenstadt, 1814) during sub lethal exposure to cypermethrin human and ecological risk assessment: *An International Journal* 24(8): 2240-2246.
- Öztürk, S., Parlak, G., 2007. *Gıda Koruyucu Maddesi Olan Bifenil'in İnsan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi, Kromozom Anormalliği ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri* (Master thesis), Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Patel, A. K., Pandey, M., Bajpayee, D. Parmar., A, Dhawan., 2006. Mouse DNA damage caused by cypermethrine in its organs and tissues: evidence from the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 607: 176 – 183.

- Pesonen, M., Andersson, T. B., 1997. Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic toxicology*, **37**(2): 14.
- Radi, A. R., Hai, D. Q., Matkovics, B., Gabrielak, T., 1985. Comparative antioxidant enzyme study in fresh water fish with different types of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81**(395-3993): 253-267.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., 2004. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and Drug Development Technologies*. **2**(1): 51-62.
- Saha, B. K., Gupta, B. P., 2011. The development and metamorphosis of an endangered frog, *Rana Leptoglossa* (Cope, 1868). *International Journal of Advanced Biological Research*. **1**(1): 67-76.
- Sarba, F. S., Mehana, S. D., 2015. Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal Agriculture and Food Sciences* **3**: 216 40-60.
- Sayed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in fresh water fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**: 295
- Scarpato, R., Migliore, L., Barale, R., 1990. The micronucleus assay in anadontacygnea for the detection of drinking water mutagenity, *Mutation Research*, **245**: 231-237.
- Scassellati, S. G., 1996. An evaluation of toxic and genotoxic risk from work-related exposure to chemical compounds. *Prevenzione Oggi*. **6**: 125-138.
- Sendensky, A., Dufour, J. F., 2011. Liver physiology. in *Chronic Liver Failure* (33-45).
- Sharma, D., Ansari, B., 2010. Effect of the synthetic pyrethroid deltamethrin and the neem-based pesticide achool on the reproductive ability of zebrafish, *Danio rerio* (*Cyprinidae*). *Archives of Polish Fisheries*, **18**(3): 157-161.
- Singh, N. N., Das, V. K., Srivastava, A. K., 1997. Formothion and propoxur induced ionic imbalance and skeletal deformity in a catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Journayly Environmental Biology* **18**: 357-363.
- Srivastav, A. K., Srivastava, S. K., Srivastav, S. K., 1997. Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **59**(5): 841-846.
- Srivastava, P., Singh, A., Pandey, A. K., 2016. Pesticides toxicity in fishes: *Biochemical, Physiological and Genotoxic Aspects Biochemical And Cellular Archives*, **16**(2):199-218.
- Sulak, M. T., Yatmaz, H. C., 2010. Removal of textile dyes from aqueous solutions with eco-friendly biosorbent. *Desalination and Water Treatment*,(1-3): 169-177.
- Svobodova, Z., Luskova, V., Drastichova, J., Svoboda, M., Ilabek, V., 2003. Effect of deltamethrin on haematological indices of *Common Carp* (*Cyprinus carpio* L.), *Acta Veterinaria Brno*, **72**: 79-85.
- Tiryaki, O., Can, R., Horuz, S. 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, **26**(2): 154-169.
- Toros, S., Maden, S., 1991. Tarımsal savaşım yöntem ve ilaçları. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları*. Ankara.

- Tuncer, E., 1987. Tarımsal ilaçların çevre kirliliği üzerine etkileri ve alınması gereken önlemler, *T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Karantina Genel Müdürlüğü*, Sivas, 5s.
- Uggini, G., Patel, S., 2010. Balakrishnan embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: a comparative study using two commercial formulations. *Environmental Toxicology* **27**(3): 166-17.
- Ünal, G., Çetinkaya, O., Elp. M.,1999. Histological investigation of gonad development of *Chalcalburnus tarichi* (P., 1811). *Turkish Journal of Zoology*. **23**: 329-338.
- Velisek, J., Jurcikov, J., Dobsikov, R., Svobodov, Z., Piackov, V., Machov, J., Novotn, L., 2007. Effects of deltametrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **23**: 297-301.
- Velmurugan, B., Selvanayagam, M., Cengiz, E., Unlu, E., 2007. The effects of monocrotophos to different tissues of freshwater fish, *cirrhinus mrigala* bull. *Environmental Contamination Toxicology*. **78**: 450- 454.
- Viran, R., Unlu, E., Polat, H., Koçak, O., 2003. Investigation of acute toxicity of deltametrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**: 82-85.
- Weishburger, J., H., Willaims, G.M., 1991. Critical effective method to detect genotoxic carcinogens and neoplasm-promoting agents. *Environmental Health Perspective*. **90**: 121-126.
- Yıldırım, M., Benli, A., Selvi, M., Özkul, A., Erkoç, F., Koçak, O.,2006. Acute toxicity, behavioral changes, and histopathological effects of deltametrin on tissues (gills, liver, brain, spleen, kidney, muscle, skin) of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fingerlings, *Environmental Toxicology:An international journal*. **21**(6): 614-620.

ÖZ GEÇMİŞ

Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI, 1993 yılında Kahramanmaraş'ta doğdu. İlköğretimini Mehmet Şeref Eğinlioğlu İlköğretim Okulunda, ortaokulu ise 12 Şubat İlköğretim Okulunda tamamladı. Lise öğrenimini Hoca Ahmet Yesevi Lisesinde tamamladı. 2011 yılında kazandığı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2015 yılında tamamladı. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı.





VAN YÜHADYEK
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı Research Title	Deltametrin'in Van Balığı Primer Hepatosit Kültüründe Sitotoksik, Genotoksik ve Oksidatif Hasarının Belirlenmesi Determination Of Cytotoxic, Genotoxic And Oxidative Damage Of Delthamethrin In Van Fish Primary Hepatocyte Culture	
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator : Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Ayşe Nur KIRACÇAKALI	
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date:	01.05.2018	
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date:	01.05.2020	
Proje Süresi / Total Time of Project:	24 Ay	
Proje No / Project Number:	FYL-2018-7607	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):	Van YYÜ, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü	
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding:	7.999,56 TL	
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30/05/2019 tarih ve 2019/05 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 30/05/2019 (decision number 2019/05)		
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE/Member Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE/Member Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE/Member Prof. Dr. Nalan ÖZDAL
ÜYE Prof. Dr. Atilla DURMUŞ	ÜYE/Member Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	ÜYE/Member Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Oruc ALLAHVERDİYEV	ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Canser Yılmaz DEMİR	ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Hacer ŞAHİN AYDINYURT
ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Şükri ONALAN	ÜYE/Member Vet. Hek. Kerem OĞRAK	ÜYE/Member Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET
ÜYE/Member Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU		

T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih:18/07/2019

Tez Başlığı / Konusu: Deltametrin'in Van Balığı (*Alburnus tarichi*) Primer Hepatosit Kültüründe Sitotoksik, Genotoksik Ve Oksidatif Hasarının Belirlenmesi

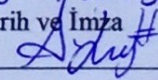
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 39 sayfalık kısmına ilişkin, 18/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 (Beş) tir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihali içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabulettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

18.07.2019
Tarih ve İmza


Adı Soyadı: Ayşe Nur KIRAÇÇAKALI

Öğrenci No: 17910002139

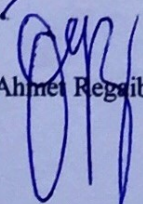
Anabilim Dalı: Biyoloji Anabilim Dalı

Programı:

Statüsü: Y.Lisans Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Doç. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ



ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. Savaş ŞENSOY
Enstitü Müdürü

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

