

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DIMETHOATE UYGULAMASININ  
*ONCORHYNCHUS MYKISS*'TE BİYOKİMYASAL  
VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERE  
ETKİLERİ İLE DNA HASARININ VE ENDOKRİN  
BOZUCU POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ  
DOKTORA TEZİ**

**Demet DOĞAN**

**OCAK 2011**

**Dimethoate Uygulamasının *Oncorhynchus mykiss*'te  
Biyokimyasal ve Hematolojik Parametrelere Etkileri  
ile DNA Hasarının ve Endokrin Bozucu  
Potansiyelinin Araştırılması**

**Gaziantep Üniversitesi  
Biyoloji Bölümü  
Doktora Tezi**

**Danışman  
Doç. Dr. Canan CAN**

**Demet DOĞAN  
Ocak 2011**

T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**Tezin Adı:** Dimethoate Uygulamasının *Oncorhynchus mykiss*'te Biyokimyasal ve Hematolojik Parametrelere Etkileri ile DNA Hasarının ve Endokrin Bozucu Potansiyelinin Araştırılması

**Öğrencinin, Adı Soyadı:** Demet DOĞAN  
**Tez Savunma Tarihi:** 20.01.2011



Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Canan CAN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Doktora tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

İmzası

Prof. Dr. Saadet DEMİRÖRS SAYGIDEĞER



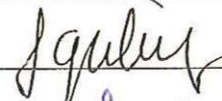
Doç. Dr. Canan CAN



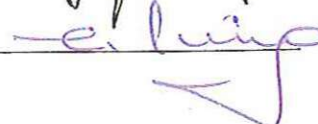
Doç. Dr. Mutlu Nisa ÜNALDI CORAL



Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER



Yrd. Doç. Dr. Murat KÜTÜK



## ÖZET

### **DIMETHOATE UYGULAMASININ *ONCORHYNCHUS MYKISS*'TE BİYOKİMYASAL VE HEMATOLOJİK PARAMETRELERE ETKİLERİ İLE DNA HASARININ VE ENDOKRİN BOZUCU POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOĞAN, Demet  
Doktora Tezi, Biyoloji Bölümü  
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Canan CAN  
Ocak 2011, 120 sayfa

Bu araştırmada, dimethoate'nin *Oncorhynchus mykiss* dokularında hematolojik, biyokimyasal, genotoksik etkileri ile nörotoksosite ve endokrin bozucu potansiyeli birlikte ele alınarak araştırılmıştır. Bu amaçla ergin *O. mykiss* 5, 15 ve 30 gün süre ile pestisit 0.0735 mg/L, 0.3675 mg/L ve 0.7350 mg/L derişimlerinin etkisinde bırakılmıştır. Hematolojik analizlerde oto analizör, oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler ve DNA hasarının incelenmesinde comet analizi kullanılmıştır. Özellikle uzun süreli pestisit uygulamasından sonra eritrosit ve lökosit sayılarında, hemoglobin, hematokrit, MCV ve MCH değerlerinde belirlenen azalma mikrositik hipokromik anemi geliştiğine işaret etmektedir. Dimethoate stresinin neden olduğu yüksek metabolik talebi karşılamaya yanıt olarak belirlenen hiperglisemik ve hipoproteinemik durum, *O. mykiss*'te gözlenen davranışsal değişimler ile desteklenmektedir. Karaciğer ve beyin dokularında AChE spesifik aktivitesinde %45-94 oranında belirlenen inhibisyon, dokularda asetilkolin birikimi ve kolinerjik iletimde bozulmanın göstergesidir. Gözlenen davranışsal anormalliklerin dimethoate indüklü nörotoksiteden kaynaklandığı düşünülmektedir. Dimethoate *O. mykiss*'te anti-androjenik etki göstermemiştir, ancak 17 $\beta$ -estradiol düzeyinde belirlenen değişimle desteklendiği üzere H-P ekseninde son ürün inhibisyonunu değiştirerek ve bir östrojen taklit gibi davranarak endokrin bozucu etkiye neden olmuştur. Aminotransferazlar ALT ve AST enzim aktivitelerinde belirlenen süre ve derişimle pozitif ilişkili artış, dimethoate'nin toksik etkisini doğrudan karaciğer dokusu üzerinde göstererek hücre membran permeabilitesini bozduğunu göstermektedir. *O. mykiss* karaciğer ve beyin dokularında antioksidan enzim aktivitelerinde belirlenen bifazik yanıt ve lipid peroksidasyonunun artışı, antioksidan savunmanın reaktif türleri etkisiz hale getirmek için yeterli olmadığını ve dimethoate uygulamasının oksidatif stres oluşumu ile sonuçlandığını göstermektedir. Ayrıca düşük antioksidan kapasitesi nedeniyle beyin dokusunun, karaciğere nazaran oksidatif strese daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Comet analizi ile, pestisit uygulanan grupta DNA hasar düzeyinin kontrole göre önemli oranda yüksek bulunması, dimethoate'nin genotoksik etkisini açıkça ortaya koymaktadır. Bu çalışma ile, farklı toksisite biyomarkırlarının birlikte incelenmesinin, kimyasalın toksik profilinin değerlendirilmesinde daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine yardımcı olduğu ve subletal derişimlerde *O. mykiss*'te belirlenen yanıtlar dikkate alındığında, dimethoate'nin oldukça toksik olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Dimethoate, *O. mykiss*, oksidatif stres, endokrin bozulması, DNA hasarı

## ABSTRACT

### EFFECTS OF DIMETHOATE APPLICATION ON BIOCHEMICAL AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS AND INVESTIGATION OF DNA DAMAGE AND ENDOCRINE DISRUPTION POTENTIAL

DOĞAN, Demet

Ph.D. Thesis in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Canan CAN

January 2011, 120 pages

Hematological, biochemical and genotoxic effects together with neurotoxicity and endocrine disruption potential of dimethoate in *Oncorhynchus mykiss* tissues were investigated in this research. For this reason, adult *O. mykiss* were exposed to 0.0735 mg/L, 0.3675 mg/L and 0.7350 mg/L of pesticide concentrations for 5, 15 and 30 days. The autoanalyzer for hematologic analyses, spectrophotometric methods to determine oxidative stress parameters and comet assay for DNA damage were used. Determined decrease in erythrocyte and leucocyte numbers, hemoglobin and hematocrit, MCV and MCH especially after prolonged exposure refers to occurrence of microcytic hypochromic anemia. Hyperglycemic and hypoproteinemic conditions detected as response to compensate high metabolic demand caused by dimethoate stress are supported by behavioral changes observed in *O. mykiss*. Inhibition rate of 45-94% in AChE specific activity in liver and brain tissues is sign of acetylcholine accumulation and impairment in cholinergic transmission in tissues. It is assumed that observed behavioral abnormalities are caused by dimethoate induced neurotoxicity. Dimethoate did not show anti-androgenic effect in *O. mykiss*, however it introduced endocrine disrupting effect by changing feedback mechanism on H-P axis and functioning as estrogen mimic as confirmed by altering 17 $\beta$ -estradiol levels. Duration- and concentration-dependant increase in enzyme activities of aminotransferases of ALT and AST is revealed that dimethoate exerts its toxic action directly on liver tissue and impairs cell membrane permeability. Biphasic response obtained in antioxidant enzyme activities of liver and brain tissues of *O. mykiss* and increase in lipid peroxidation are elucidated that antioxidant defense was not effective enough in order to inactivate reactive species and dimethoate application resulted in oxidative stress. In addition, it was determined that brain tissue is more sensitive than liver to oxidative stress because of low antioxidant capacity. Detecting high level of DNA damage in pesticide exposed groups over control by comet assay clearly verified genotoxic action of dimethoate. It is concluded with this investigation that analysing different toxicity biomarkers together contributes to obtain more meaningful results in evaluating toxic profile of chemical and dimethoate is highly toxic when responses observed in *O. mykiss* at sublethal concentration were taken into account.

**Key Words:** Dimethoate, *O. mykiss*, oxidative stress, endocrine disruption, DNA damage

## TEŞEKKÜR

Bu projenin tüm aŐamalarında sonsuz heyecanı ve desteği ile rehberliğinden çok Őey öğrendiğim danıŐmanım sayın Doç. Dr. Canan Can'a,

Tez ęalıŐmalarımnda bilgi ve desteklerini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Saadet D. Saygıdeğer ve Doç. Dr. Mutlu Nisa Ünaldı Coral'a,

Comet analizi için laboratuvarlarını kullanmamıza izin veren ve analizlerle birebir ilgilenen Prof. Dr. Abdurrahim Koğyiğit'e ve asistanları ArŐ. Gör. Hasan Bilinę ve Biyolog Abdullah Taskın'a,

Comet analiz sonuçlarının bilgisayarlı görüntü analizlerinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Murat Dikilitaş'a,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi olarak yanımda olan aileme ve eŐim Öğr. Gör. Dr. Muhittin Doğan'a sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa no</b>
ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
TABLolar LİSTESİ	IX
KISALTMALAR LİSTESİ	XII
BÖLÜM 1: GİRİŞ	1
1.1. Hedef Organ Toksisitesi	4
1.2. Biyoindikatör Olarak Balıklar	6
1.3. Biyomarkır	7
1.3.1. Oksidatif Stres Parametreleri	8
1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz	10
1.3.1.2. Katalaz	10
1.3.1.3. Glutatyon Peroksidaz	11
1.3.1.4. Lipid Peroksidasyonu	11
1.3.2. Nörotoksisite	12
1.3.3. Hematolojik Parametreler	15
1.3.3.1. Tam Kan Sayımı	15
1.3.3.2. Biyokimyasal Kan Parametreleri	16
1.3.4. Endokrin Parametreler	17
1.3.5. Organosomatik İndeks	20
1.3.6. Davranış	20
1.3.7. Genotoksisite	20
BÖLÜM 2: LİTERATÜR ÖZETLERİ	25
2.1. Oksidatif Stres	26
2.2. AChE Aktivitesi	28
2.3. Kan Parametreleri	30
2.4. Davranış	33

2.5. Endokrin Bozulması	34
2.6. Genotoksisite	37
<b>BÖLÜM 3: MATERYAL VE METOD</b>	<b>41</b>
3.1. Materyal	41
3.1.1. Test Organizması	41
3.1.2. Su	41
3.1.3. Test Bileşigi	41
3.2. Metod	41
3.2.1. Deney Dizaynı	41
3.2.2. Analiz Yöntemleri	42
3.2.2.1. Biyokimyasal Kan Parametreleri ve Hematolojik İndeksler	42
3.2.2.2. Asetilkolinesteraz Yöntemi	43
3.2.2.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi	44
3.2.2.4. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi	45
3.2.2.5. Katalaz Yöntemi	47
3.2.2.6. Malondialdehit Yöntemi	48
3.2.2.7. Protein Yöntemi	49
3.2.2.8. Comet Analizi	50
3.2.3. İstatiksel Analiz	51
<b>BÖLÜM 4: BULGULAR</b>	<b>53</b>
4.1. Davranışa Etkisi	53
4.2. Hematolojik İndeksler ve Biyokimyasal Kan Parametreleri	53
4.2.1. Toplam Eritrosit Sayısına (RBC) Etkisi	53
4.2.2. Toplam Lökosit Sayısına (WBC) Etkisi	54
4.2.3. Trombosit (PLT) Miktarına Etkisi	55
4.2.4. Hemogloblin (Hb) Miktarına Etkisi	55
4.2.5. Hematokrit (HCT) Miktarına Etkisi	56
4.2.6. Ortalama Eritrosit Hacmine (MCV) Etkisi	56
4.2.7. Ortalama Eritrosit Hemoglobline (MCH) Etkisi	57
4.2.8. Ortalama Eritrosit Hemogloblin Derişimine (MCHC) Etkisi	57
4.2.9. Toplam Protein Miktarına Etkisi	58
4.2.10. Glukoz Miktarına Etkisi	59
4.2.11. Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesine Etkisi	60
4.2.12. Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesine Etkisi	61



4.2.13. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesine Etkisi	61
4.3. Steroid Hormonlar	62
4.3.1. Testosteron Miktarına Etkisi	62
4.3.2. 17 $\beta$ -Estradiol Miktarına Etkisi	62
4.3.3. Kortizol Miktarına Etkisi	63
4.4. Organosomatik İndeksler	64
4.4.1. Hepatosomatik İndekse Etkisi	64
4.4.2. Gonadosomatik İndekse Etkisi	65
4.5. AChE Aktivitesine Etkisi	65
4.6. Antioksidan Enzimler	67
4.6.1. SOD Aktivitesine Etkisi	67
4.6.2. GPx Aktivitesine Etkisi	69
4.6.3. CAT Aktivitesine Etkisi	70
4.7. MDA Miktarına Etkisi	72
4.8. Protein Miktarına Etkisi	73
4.9. DNA Hasarı	75
BÖLÜM 5: TARTIŞMA	79
BÖLÜM 6: SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	118

## ŞEKİLLER LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
Şekil 1.1. Dimethoate'nin yapısal formülü.	3
Şekil 1.2. Dimethoate'nin metabolik yolu.	4
Şekil 1.3. Asetilkolinin hidrolitik parçalanması	13
Şekil 1.4. AChE fosforilasyonu ve fosforile enzimin dealkilasyonu. (a) serbest enzim, (b) organofosfat, (c) kovalent fosforil eklentisi, (d) karbonyum arabileşik, (e) dealkilasyon ürünü (R-OH, R-türevli alkenler), (f) serinin monofosfat esteri.	14
Şekil 1.5. Görsel analizde comet kategorileri	23
Şekil 4.1. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum toplam protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	58
Şekil 4.2. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum glukoz miktarının kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	59
Şekil 4.3. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum AST aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	60
Şekil 4.4. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum ALT aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	61
Şekil 4.5. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum 17β-Estradiol miktarının kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	63
Şekil 4.6. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te serum kortizol miktarının kontrole kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	64
Şekil 4.7. Dimethoate etkisinde <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer ve beyin dokularında AChE spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. *p<0.05 ve **p<0.01 düzeyinde önemlidir.	67

- Şekil 4.8. Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında SOD spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir. 68
- Şekil 4.9. Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında GPx spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir. 70
- Şekil 4.10. Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında CAT spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir. 72
- Şekil 4.11. Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında MDA miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir. 73
- Şekil 4.12. Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir 75
- Şekil 4.13. *O. mykiss* eritrositlerinde (a) normal DNA hücresi, eritrositlerde dimethoate uygulamasından 1 saat (b) ve 2 saat (c) sonra DNA hasarı. 76
- Şekil 4.14. Dimethoate etkisinde *O. mykiss* eritrositlerinde TL, LC, %H-DNA, %T-DNA, TM ve OTM'nin uygulama derişimlerine göre değişimleri. 76

## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
Tablo 3.1. AChE Yöntemi	43
Tablo 3.2. SOD Yöntemi	44
Tablo 3.3. GPx Yöntemi	46
Tablo 3.4. CAT Yöntemi	47
Tablo 3.5. MDA Standart Eğrisinin Çizimi	48
Tablo 3.6. MDA Yöntemi	49
Tablo 3.7. Protein Standart Eğrisinin Çizimi	50
Tablo 3.8. Protein Yöntemi	50
Tablo 4.1. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te toplam eritrosit sayısına ( $10^6/\mu\text{L}$ ) etkisi.	54
Tablo 4.2. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te toplam lökosit sayısına ( $10^3/\mu\text{L}$ ) etkisi.	54
Tablo 4.3. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te toplam trombosit miktarına ( $10^3/\mu\text{L}$ ) etkisi.	55
Tablo 4.4. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te hemoglobin miktarına (g/dL) etkisi.	55
Tablo 4.5. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te hematokrit miktarına (%) etkisi.	56
Tablo 4.6. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te MCV'ye (fL) etkisi.	56
Tablo 4.7. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te MCH'ye (p/g) etkisi.	57
Tablo 4.8. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te MCHC'ye (g/dL) etkisi.	57
Tablo 4.9. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum toplam protein miktarına (g/dL) etkisi.	58
Tablo 4.10. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum glukoz miktarına (mg/dL) etkisi.	59
Tablo 4.11. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum AST aktivitesine (IU/L) etkisi.	60
Tablo 4.12. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum ALT aktivitesine (IU/L) etkisi.	61
Tablo 4.13. Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum ALP aktivitesine (IU/L) etkisi.	62

Tablo 4.14.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum testosteron miktarına (ng/mL) etkisi.	62
Tablo 4.15.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum 17 $\beta$ -Estradiol miktarına (pg/mL) etkisi.	63
Tablo 4.16.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te serum kortizol düzeyine (ug/dL) etkisi.	64
Tablo 4.17.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te hepatosomatik indekse etkisi.	65
Tablo 4.18.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te gonadosomatik indekse etkisi.	65
Tablo 4.19.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi	66
Tablo 4.20.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	66
Tablo 4.21.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda SOD spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	67
Tablo 4.22.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda SOD spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	68
Tablo 4.23.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	69
Tablo 4.24.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	70
Tablo 4.25.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda CAT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	71
Tablo 4.26.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda CAT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi.	71
Tablo 4.27.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi.	72
Tablo 4.28.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi	73
Tablo 4.29.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te karaciğer dokusunda protein miktarına (mg) etkisi.	74
Tablo 4.30.	Dimethoate'nin <i>O. mykiss</i> 'te beyin dokusunda protein miktarına (mg) etkisi.	74
Tablo 4.31.	Dimethoate'nin subletal derişimlerinde <i>O. mykiss</i> eritrositlerinde <i>in vitro</i> DNA hasarı.	75

Tablo 4.32. Dimethoate'nin *O. mykiss*'te eritrositlerde TL, LC, %H-DNA, %T-DNA, TM ve OTM'ye etkisi.

78

## KISALTMALAR LİSTESİ

CAPS	3-(Sikloheksilamino)-1-Propan Sülfonik asit
DMSO	Dimetil sülfoksid
DTNB	5-5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik asit)
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Okside glutasyon
HAc	Asetik asit
INT	İyodonitrotetrazolyum
LC <sub>50</sub>	Letal derişim
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
XOD	Ksantin oksidaz

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Kirlilik hava, su veya toprağın fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklerinde insanların ve diğer yaşam formlarının sağlığını, hayatta kalmasını veya faaliyetlerini istenmeyen yönde etkileyebilecek değişimlerdir (Spellman, 1999). Endüstrileşme, yapım ve nakliye gibi gelişim için tercih edilen insan faaliyetleri tehlikeli maddelerin oluşumuna ve çevreye salınmasına neden olmakta, çevrenin kompozisyonunu ve kompleks yapısını değiştirmektedir (Khopkar, 2004).

Su kirliliği suda kaliteyi bozma eğiliminde olan, tehlikeli ya da suyun kullanılabilirliğini etkileyen herhangi yabancı maddenin (organik, inorganik, radyolojik veya biyolojik) bulunması olarak tanımlanmaktadır. Su kirliliğinin noktasal ve noktasal olmayan kaynak olmak üzere iki temel kaynağı vardır. Noktasal kaynaklar kirleticileri doğrudan su kaynaklarına boşaltan fabrikaları, atık su arıtma tesislerini ve septik sistemleri kapsamaktadır. Noktasal olmayan kaynaklar pestisitlerin, gübrelerin ve zararlı kimyasalların tarlalardan, arazilerden ve yapım alanlarından yıkanmasını kapsar ve tanımlanmaları zordur (EPA, 1997).

İnsanlar içme suyu, akuatik canlıların besin olarak kullanılması ve dinlenme tesislerinde tatlı suyun kullanılması ile sucul çevre ile ilişki halindedirler. Akuatik canlılarda saptanan kirletici etkileri, insan sağlığı için potansiyel hasarın erken uyarısı olarak kabul edilmektedir. Rutin yöntemler kullanılarak analiz edildiğinde bir su örneğindeki kirletici derişimi belirleme sınırlarının altında olabilmektedir. Ancak bazı organizmaların vücutlarında dereceli olarak birikim meydana geldiğinden, bu canlıların vücutlarındaki derişimler zamanla çevresel kirlilik düzeyini göstermektedir. Ağır metaller, poliklorobifeniller ve pestisitlerin sucul habitatlarda neden olduğu sorunlar bilinmektedir ve bu bileşikler insan sağlığını tehdit etmektedir (Mason, 2001).

Pestisit; fitopatolojik ve entomolojik zararlıları öldürmek veya kontrol etmek için kullanılan tüm kimyasal ve biyolojik ürünleri kapsayan genel bir terimdir. Pestisitler etkili ürün elde edilmesini sağlayarak, besinlerin toksik mantarlarla kontaminasyonunu

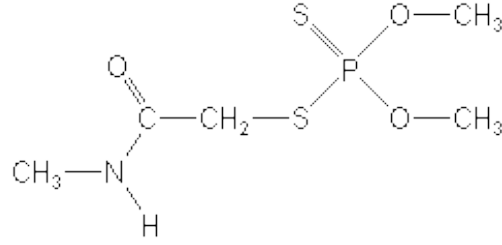


azaltarak ve insan hastalıklarını yayan haşereleri kontrol ederek sağlığımıza ve yaşam kalitemize önemli katkı sağlamaktadırlar. Ancak biyolojik olarak aktif tasarlandıklarında etkilerini hedef olmayan türler (insan ve diğer türler) üzerinde de gösterebilirler. Ayrıca bir hedef organizmaya etkileri ekolojik dengeyi istenmeyen şekilde değiştirebilmektedir (ACP, 2003).

Pestisitler kimyasal yapılarına göre organoklorlular, organofosforlu pestisitler, karbamatlar ve piretroitler olarak sınıflandırılmaktadırlar (Laws, 2000). Organofosforlu pestisitlerin doğada hızlı parçalanmaları, organoklorlu pestisitlerin yerini almalarına ve yoğun olarak kullanılmalarına neden olmuştur. Organoklorlu pestisitlere nazaran hızlı parçalanmalarına rağmen, hedef spesifiteleri yoktur ve hedef olmayan omurgalı ve omurgasız canlılara karşı yüksek akut toksisite gösterirler. Organofosforlu bileşikler fosfora çift bağlı atoma (oksijen ya da sülfür) göre fosfatlar veya fosforotioatlar olarak adlandırılmaktadır. Ticari organofosforlu insektisitlerin çoğu fosforotioattır, çünkü P=S formu daha stabildir ve lipide çözünürlüğü fazladır. Esterazları inhibe etmek için oksidatif desülfürasyon reaksiyonuna ihtiyaç duymaktadırlar ve okside formları (P=O) genellikle okson olarak adlandırılmaktadır. Toksik etkilerini nörotransmitter asetilkolinin (ACh) hidrolizini katalizleyen enzim olan asetilkolinesterazın (AChE, EC 3.1.1.7) geri dönüşümsüz inhibisyonu şeklinde gösterirler (Fukuto, 1990; Moretto ve Lotti, 1998).

Biyolojik sistemlerde organofosforlu bileşiklerin detoksifikasyonu faz I ve faz II olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonlarda (oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz), lipide çözünen moleküllere OH, COOH, NH<sub>2</sub> ve SH gibi polar gruplar eklenerek bileşiğin polaritesi arttırılmaktadır. Faz II reaksiyonlarda glukuronik asit, sülfürik asit, aminoasitler veya glutatyon gibi endojen bileşikler polar gruplarla reaksiyona girerek faz I reaksiyon ürününün daha asidik ve polar olması sağlanmaktadır. Bu ürünlerin genel olarak biyolojik aktiviteleri azdır ve suda çözünürlükleri yüksektir (Abou-Donia, 1995).

Dimethoate [O,O-dimethyl S-methylcarbamoylmethyl phosphorodithioate] (Şekil 1.1) kontak ve sistemik etkili organofosforlu bir pestisittir. 1956 yılında ruhsatlandırılmıştır. Akarlar, afitler, kirpik kanatlılar ve beyazsineklere karşı yaygın olarak kullanılmaktadır.



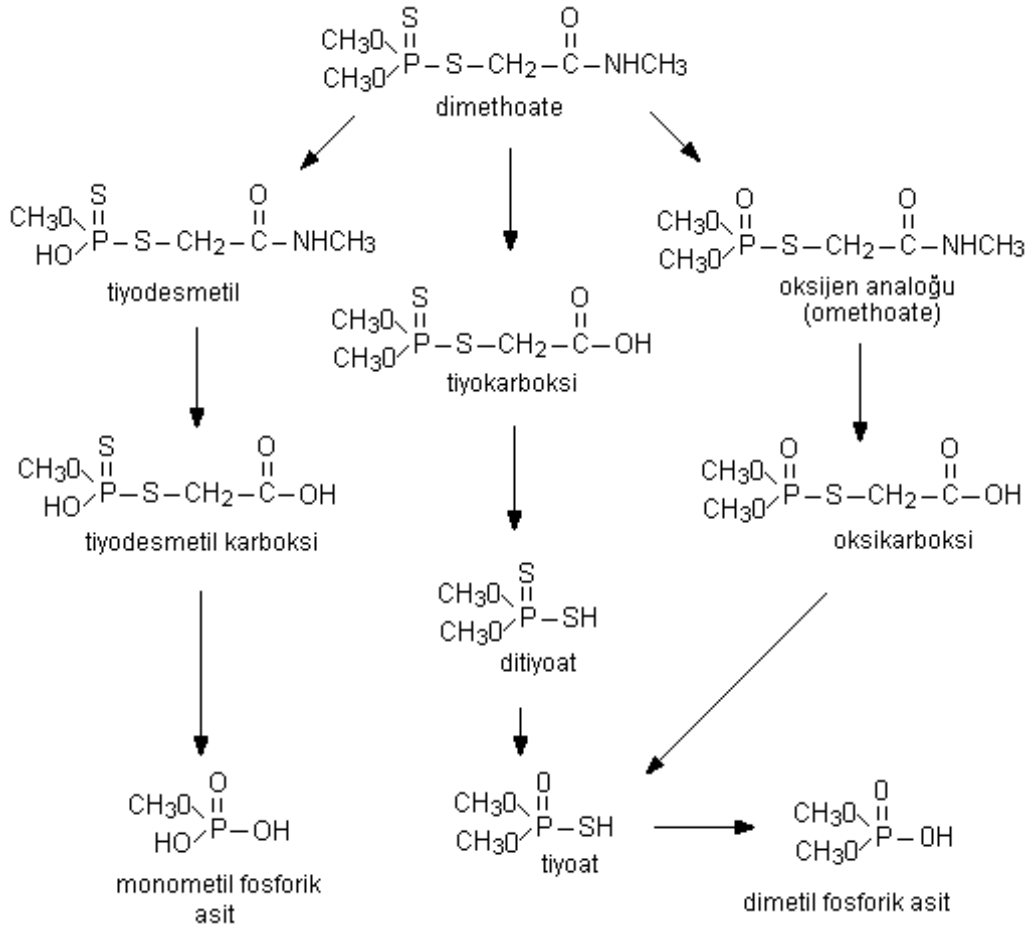
Şekil 1.1 Dimethoate'nin yapısal formülü (FAO/ WHO, 1980)

Dimethoate fosforotioat bir moleküldür. Sitokrom P-450 bağımlı monooksijenazlar yoluyla oldukça reaktif metabolitlere biyolojik olarak aktive edilmektedir. Dimethoate'nin oksijen analogu dimethokson, pestisit toksisitesinde önemli rol oynamaktadır. Dimethokson'un kendisi de omethoate olarak bilinen bir insektisit olarak kullanılmaktadır (Chambers ve Chambers, 1991).

Dimethoate suda 39 g/L (21 °C), kloroform, metilen, benzen, toluen, alkoller ve esterlerde yüksek çözünürlüğe sahiptir. Doğada pestisit temel inaktivasyon yolu, hidrolitik parçalanmadır. Nemli havada fotokimyasal olarak hidrolitik ve oksidasyon ürünlerine parçalanmaktadır. Topraktaki çözünürlüğü ve akümüasyonu toprağın türüne, sıcaklığa, neme ve pH düzeyine bağlı olarak değişmektedir.

Dimethoate'nin temel metabolik yolu hidroliz ve oksidasyondur (Şekil 1.2). Hidroliz ürünleri tiyokarboksi türevi yoluyla fosforik, tiyofosforik veya ditiyofosforik asitlerdir. Tiyodesmetilkarboksi türevi yoluyla ikinci bir parçalanma da meydana gelebilmektedir. Pestisit, karaciğer sitokrom P<sub>450</sub> enzim sistemi ile P-S kısmının P-O türevine dönüştürülmesi ile biyolojik olarak aktive edilmektedir (IPCS, 1989).

Dimethoate toksisitesinin temel mekanizması AChE'nin aktif bölgesinde serin rezidülerinin fosforilasyonudur. Bu durum solunumun, miyokardiyal ve nöromusküler iletimin bozulması ile sonuçlanmaktadır. Ancak, pestisit etkileri nörotoksisite ile sınırlı değildir. Oksidatif stres oluşturarak antioksidan yanıtı neden olduğu (Hamed vd., 1999), testis hasarı ve testosteron biyosentezinin inhibisyonu ile endokrin sistemi bozduğu (Walsh vd., 2000; Sayım, 2007; Astiz vd., 2009), karaciğerde histopatolojik değişikliklere yol açtığı (Rodrigues ve Fanta, 1998) ve karsinojenik etkilere neden olduğu (Reuber, 1984) bildirilmiştir. Balıklarda LC<sub>50</sub> değeri *Clarias batrachus* Linnaeus, 1758 için 65 ppm, *Lepomis macrochirus* Rafinesque, 1819 için 6 ppm ve *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 için 22.4 ppm olarak bildirilmiştir (Begum, 2009).



Şekil 1.2. Dimethoate'nin metabolik yolu (FAO/WHO, 1967).

### 1.1. Hedef Organ Toksisitesi

Ksenobiyotik terimi canlı organizmalara yabancı, ancak farklı yollarla organizma ile temas halinde olan tüm bileşikler için ifade etmek için kullanılmaktadır. Tüm dokular ksenobiyotiklerin toksik etkilerine karşı farklı derecede duyarlıdır ancak çoğu kimyasal hedef organlar olarak tanımlanan spesifik organlarda hasara neden olma eğilimine sahiptir. Dokuların toksisiteye duyarlılığını etkileyen faktörler arasında kirleticilerin vücutta dağılımı ve toksisite mekanizmaları önemli yer tutmaktadır. Bir kimyasalın spesifik bir organda zararlı etkilerini göstermesi için öncelikle etki bölgesine ulaşması gerekmektedir. Organın bu strese yanıtını belirleyen etmenler arasında bileşiğin fizikokimyasal özellikleri, kimyasalın ve metabolitlerinin doku ve vücuttaki metabolizması ve dokunun kimyasal indüklü hasarı onarma yeteneği sayılabilir (Cohen, 1986).

Karaciğer potansiyel olarak toksik çok sayıda maddeye maruz kalmakta ve hayvan çalışmalarında genellikle hedef organ olarak kullanılmaktadır. Sistemik dolaşıma ve

diğer dokulara giriş kapısı olarak hasara daha duyarlıdır ve sistemik dolaşımında seyreltilmelerinden önce yabancı bileşiğin çok daha yüksek derişimlerine maruz kalmaktadırlar. Karaciğer yapısının büyük kısmını oluşturan hepatositler metabolik olarak çok aktiftirler. Organizmanın fonksiyonu için gerekli olan protein sentezi, fazla azotun atılması ve lipid metabolizması gibi farklı biyokimyasal reaksiyonları yürütmektedirler. Bu nedenle yabancı bir bileşiğin bu metabolik aktiviteyi etkilemesi toksisite ile sonuçlanabilmektedir. Karaciğerin toksisite için hedef organ olmasının bir diğer nedeni safra oluşumu yoluyla bir boşaltım fonksiyonuna sahip olmasıdır. Ksenobiyotikler ve/veya metabolitleri böylece atılmakta ve safradaki artan derişimleri doğrudan safra kanalına hasar verebilmektedir. Alternatif olarak, safraya çıkartılan yüksek dozlardaki kimyasal boşaltma işlemini doyurmakta ve hepatositlerde yüksek derişimde birikime neden olabilmektedir (Timbrell, 2002).

Karaciğerin diğer önemli özelliği kimyasalların aktivasyon ve detoksifikasyonunda anahtar rol oynamasıdır. Bu işlemde lipofilik bileşikler daha hidrofilik metabolitlere dönüştürülerek, vücuttan atılmaları kolaylaştırılmaktadır. Biyotransformasyon ile lipofilik bileşiklerin vücutta birikimlerinin önlenmesine rağmen, genellikle reaktif toksik metabolitlerin üretimi ile sonuçlanmaktadır. Bu metabolitler karaciğer hasarına neden olabilecek bir seri olayı başlatabilmektedirler. Balıklarda karaciğer lipid açısından zengin olduğundan çoğu organik kirletici için temel biyoakümülyasyon bölgesidir. Biyoakümülyasyon karaciğerde morfolojik hasar ve detoksifikasyon enzimlerinin aktivitelerinin inhibisyonu riskini arttırmaktadır (Kime, 2001).

Sinir sistemi, endokrin sistem ile birlikte, sabit bir homeostazis sağlamakta ve dış uyarılara hızla yanıt vermektedir. Sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel birimi nöronlardır. Görevleri impuls biçiminde bilgiyi oluşturmak, iletmek ve almaktır. Olgun nöronlar mitoz geçirme yeteneğinde olmadığından, sinir sistemi hasar gördüğünde nöronlar yenilenemeyecek ve hasar kalıcı olacaktır. Bu durum sinir sistemini nörotoksik kimyasalların etkilerine karşı özellikle duyarlı hale getirmektedir (Robinson ve Thorn, 2005).

Kan beyin engeli bazı nörotoksinlere karşı bir dereceye kadar koruma sağlamaktadır. Kapiller endotelyal hücrelerin sıkı bağlantıları ve glial hücrelerin işlemleri kan beyin engelinin düşük permeabilitesine katılan temel yapısal özelliklerdir. Kan dolaşımında olan kimyasallar interstitial beyin sıvısına ulaşmak için kapiller endotelyal hücre

membranını ve glial hücre membranını geçmek zorundadırlar. Beyin interstitial sıvısının düşük protein içeriği plazma proteinlerine bağlanan lipofilik kimyasalları sınırlamaktadır. Bu nedenle beyne kimyasal girişi serbest, lipofilik, iyonize olmamış ve özel taşıyıcı sistemlerle taşınan maddelerle sınırlıdır. İyonize ve plazma proteinlerine bağlı kimyasallar kan beyin engelini geçememektedirler Lipofilik olduklarından organofosforlu pestisitler de kan beyin engelini kolayca geçerek etkilerini sinir sisteminde göstermektedirler (Dix, 2001).

## **1.2. Biyoindikatör Olarak Balıklar**

Genel olarak insan sağlığı açısından kirleticilerin toksisitesini araştırmak, hücrel hasar ve yanıt arasındaki mekanizmaları aydınlatmak için memeli türleri model olarak kullanılmaktadır. Balıklar insanlarla yakın evrimsel ilişkiye ve strese karşı benzer toksikolojik ve adaptif yanıtlara sahiplerdir. Akuatik sistemler çoğu çevresel kirleticinin bir arada bulunduğu bir ortam sağlamaktadır ve bu nedenle toksisite mekanizmalarının araştırılmasında balıklar, hedef ve model organizma olarak önemli yer tutmaktadır (Kelly vd., 1998).

Tatlı su ekosistemlerinin durumunun değerlendirilmesinde, ekolojik ve ekonomik olarak önemli olan balıkların biyoindikatör olarak bazı özgün özellikleri ve avantajları vardır. Balıkların su kalitesine duyarlı oldukları ve karakteristik habitat tercihleri olduğu bilinmektedir. Balıklar akuatik ortamda kolay bulunmaktadır ve enerjinin düşük trofik seviyeden yüksek düzeye transferinde fonksiyon gördüklerinden akuatik besin zincirinde önemli bir ekolojik rol oynamaktadırlar. Ayrıca kontamine besinlerin sindirilmesi, solunum ve su teması ile farklı kimyasalları deriden dokularına alarak biriktirmektedirler. Akümüle edilen kimyasallardan bazıları toksik etkilerini göstermek için hedef bölgesine ulaşmaktadır. İnsanlar için besin kaynağı olduğundan, dokularda kimyasal birikimi ve olası etkilerinde önemli rolü vardır (Jalabert vd., 2000). Ekotoksikolojik araştırmalarda genelde laboratuvar ortamında standart toksisite testleri kullanılarak kirleticilerin tatlı su balıklarındaki etkileri değerlendirilmekte ve sonuçlar kirletici etkisinde insan sağlığında meydana gelebilecek potansiyel zararların tahmin edilmesinde kullanılmaktadır (Begum ve Vijayaraghavan, 1996; Di Giulio ve Hinton, 2008).

Test organizmasının seçiminde en önemli kriterler laboratuvar ortamında yetiştirme kolaylığı, küçük boyut, kısa yaşam süresi ve organizmaların homojenliğidir (Lawrence,

1981). *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 iyi oksijenlenmiş, temiz ve soğuk suyu tercih eden bir tatlı su balığıdır. Balıkçılıkta ve besin endüstrisinde önemli olduğundan, fizyolojik sorunlar gözlenmeden önce kirleticilerin neden olduğu biyolojik değişimlerin erken dönemde belirlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan duyarlı test organizmalarından biridir. Ayrıca, akut ve kronik toksisite çalışmalarında test organizması olarak kullanılması önerilmektedir (OECD, 1992).

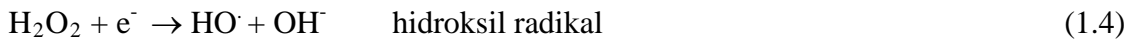
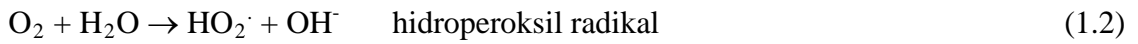
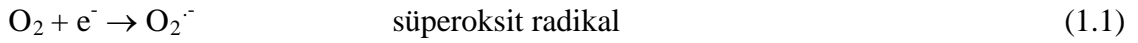
### **1.3. Biyomarkır**

Genellikle letaliteyi hedef nokta olarak kullanan geleneksel ekotoksikoloji testleri ile karşılaştırıldığında, biyomarkırların tanısasal araç olarak kullanımı yaygınlaşmaktadır. Genel olarak biyomarkırlar, kimyasal ile reseptör bölge arasındaki toksikolojik etkileşimlerin neden olduğu ilk değişiklikler olarak düşünülmektedir. Bu etkileşim hücresel düzeyde başlayan bir dizi olayı indükler (gen transkripsiyonunun bozulması, metabolik yollarda düzensizlik) ve yüksek biyolojik organizasyonda olumsuz etkilere neden olur. Geleneksel toksisite testlerinde normal olarak çalışılan etkiler (gelişimin, üremenin ve canlılığın bozulması) organizma düzeyinde meydana gelen hasarın nihai sonucu olarak düşünülmektedir (De Coen vd., 2000).

Biyomarkırlar etkide kalma, yanıt ve duyarlılık biyomarkırları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Etkide kalma biyomarkırları iç doz ve etkili doz markırları olarak sınıflandırılmaktadır. İç doz markırları vücut sıvılarında bileşiğin ve/veya metabolitlerinin ölçülmesi yoluyla belirli bir kimyasala maruz kalındığını gösteren markırlardır. Etkili doz markırları ise kimyasalın veya metabolitin toksikolojik olarak önemli bir hedefe ulaştığını göstermektedirler. Yanıt biyomarkırları, bir organizmada dokularda veya vücut sıvılarında belirlenebilen biyokimyasal, fizyolojik veya diğer değişimleri içermektedir. Ksenobiyotik uygulaması ve bir kimyasalın absorpsiyonu nedeniyle prelinik değişimleri veya olumsuz sağlık etkilerini belirlemek için kullanılmaktadır. Duyarlılık biyomarkırları, organizmanın spesifik bir ksenobiyotiğe doğal veya kazanılmış olarak yanıt verme yeteneğidir. Organizmanın etkiye duyarlılığını değiştiren genetik faktörleri ve reseptörlerdeki değişimleri kapsamaktadır. Farklı bireylerde toksik uygulamaya verilen yanıtların derecesindeki değişimleri aydınlatmaya yardımcı olmaktadır (Van der Oost vd., 2003).

### 1.3.1. Oksidatif Stres Parametreleri

Moleküler oksijen ( $O_2$ ), solunum zincirinde meydana gelen bir dizi biyokimyasal reaksiyonda hayati öneme sahip olduğundan hücre fonksiyonu için gereklidir.  $O_2$  iki su ( $H_2O$ ) molekülü oluşturmak için her seferde bir tane olmak üzere dört elektron alabilmektedir. Bu işlem sırasında ara ürünler olarak süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve hidroksil radikal ( $HO^{\cdot}$ ) gibi farklı oksijen radikalleri ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi zararlı oksijen türleri üretilmektedir. Serbest radikal atomik veya moleküler yapısı nedeniyle oldukça kararsız olan atom, molekül veya bileşiktir (Kohen ve Nyska, 2002).



Moleküler oksijene bir elektron transferi ile  $O_2^{\cdot-}$  radikal oluşur. Bu radikal, ortama ve pH'ya bağlı olarak farklı özelliklere sahiptir. Süperoksit düşük pH'da hidroperoksil ( $HO_2^{\cdot}$ ) formunda bulunmaktadır. Hidroperoksil, yüklü forma göre biyolojik membranlara daha kolay bağlanabilmektedir. Hidrofilik bir ortamda  $O_2^{\cdot-}$  ve  $HO_2^{\cdot}$  indirgeyici ajan olarak davranmaktadır. Ancak  $HO_2^{\cdot}$ 'in indirgeme kapasitesi daha yüksektir. Organik çözücülerde ise  $O_2^{\cdot-}$ 'in çözünürlüğü ve indirgeme kapasitesi daha yüksektir. Ayrıca pozitif yüklü merkezlere saldırabilen güçlü bir nükleofil ve  $H^+$  verebilen bileşikler ile reaksiyona girebilen bir oksidan gibi davranabilmektedir (Kohen ve Nyska, 2002).

Süperoksit radikallerin en önemli reaksiyonu dismutasyon reaksiyonudur. Bu reaksiyonda bir süperoksit radikali başka bir süperoksit radikal ile reaksiyona girmektedir. Sonuçta biri oksijene oksitlenirken diğeri  $H_2O_2$ 'ye indirgenmektedir.

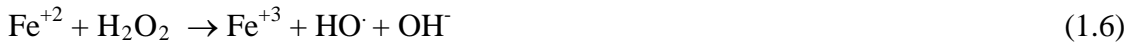


Moleküler oksijene iki elektron transferi ve süperoksit radikallerin dismutasyonu sonucu  $H_2O_2$  üretilmektedir.  $H_2O_2$  moleküllerinin reaktif oksijen metabolitleri olarak düşünülmesine rağmen, eşleşmemiş elektronları olmadığından radikal değildir. Ancak

düşük derişimde hücrede hasara neden olabilmektedir. Sulu çözeltilerde serbestçe çözünmekte ve biyolojik membranlara kolaylıkla bağlanabilmektedir. Zararlı kimyasal etkisi, oksitleyici özelliği nedeniyle doğrudan ve HO· gibi daha zararlı türlerin oluşumuna katıldığı için dolaylı etki olarak gruplandırılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Hidroksil radikal biyolojik sistemlerde farklı reaksiyonlarla üretilmektedir. Bu radikalın reaktivitesi oldukça yüksektir. Hidroksil radikal aşağıda verilen iki reaksiyon sonucu oluşmaktadır:

(i) Fenton reaksiyonu:



(ii) Haber-Weiss reaksiyonu:



Kısa ömürlüdür ve diğer moleküllere karşı yüksek afinitesi vardır. Hücrede DNA, proteinler, lipidler, aminoasitler, şekerler ve metaller ile yüksek oranda reaksiyona girebilen güçlü bir oksitleyici ajandır. Radikalın üç temel reaksiyonu hidrojen ayırma, ekleme ve elektron transferidir. Yüksek reaktivitesi nedeniyle biyolojik sistemlerdeki en reaktif radikal olarak kabul edilmekte ve üretildiği yerde yakınındaki moleküller ile etkileşebilmektedir (Ahmad, 1995).

Reaktif oksijen türleri normal metabolik işlemler sırasında sürekli üretilmektedir. Hücreler reaktif oksijen türlerinin üretimini engellemek veya oluşan türleri detoksifiye etmek için koruyucu mekanizmalar geliştirmişlerdir. Reaktif türlerin oluşumu ve uzaklaştırılmaları veya hasarlı kompleks moleküllerin (proteinler veya DNA) tamiri arasındaki denge bozulduğunda oksidatif stres meydana gelmektedir (Ahmad, 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Oksidan aracılıklı etkiler ya yüksek antioksidan enzim aktivitesi ve enzimatik olmayan bileşiklerin derişimi gibi adaptif yanıtlara ya da proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin oksidasyonları ve doku redoks durumunun bozulması gibi toksisite ile sonuçlanmaktadır. Oksiradikal oluşumunu, inhibe etme eğiliminde olan savunma sistemleri arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan



enzimler bulunmaktadır (Ahmad, 1995).

### 1.3.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), süperoksit radikalın dismutasyonunu katalizleyerek superoksit radikal toksisitesine karşı önemli bir savunma mekanizması sağlayan metalloenzimdir.



Aktif bölgelerinde yer alan geçiş meteline bağlı olarak, dört farklı izozimi bulunmaktadır; bakır/çinko (Cu/Zn) SOD, mangan (Mn) SOD, demir (Fe) SOD ve nikel (Ni) SOD. Cu/Zn SOD ökaryotların sitosolünde, kloroplastlarda ve bazı bakteri türlerinde bulunmaktadır. Ökaryotik Cu/ZnSOD, 32.000 Dalton'luk moleküler ağırlığa sahiptir ve her biri bir Cu ve bir Zn iyonu taşıyan iki protein alt birimden oluşmaktadır. Fizyolojik pH'da katalizör olmadan  $O_2^{\cdot -}$  dismutasyonunun reaksiyon hızı  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 'dir. Cu/ZnSOD bu reaksiyonu hızlandırır ( $1.6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ ) ve  $O_2^{\cdot -}$ 'in yarılanma süresini etkili biçimde kısaltır. Cu/ZnSOD siyanit ile inhibisyona oldukça duyarlıdır. Ökaryotlarda moleküler ağırlığı ve aminoasit kompozisyonu açısından sitosolik formdan farklı ekstrasellüler bir Cu/Zn SOD olduğu bilinmektedir. Her bir altbirimi bir Cu ve bir Zn iyonu taşıyan tetramerik bir glikoproteindir (135.000) (Mruk vd., 2002).

MnSOD ökaryotlarda mitokondride ve prokaryotlarda bulunmaktadır. Omurgalılarda 92.000 Dalton'luk moleküler ağırlığa sahiptir. Dört protein alt birimi ve enzim başına 2 veya 4 Mn iyonu taşır. MnSOD siyanit ile inhibe olmaz, Cu/ZnSOD ile farklılıklarına rağmen katalizledikleri reaksiyon aynıdır. FeSOD bitki sitosolünde ve bazı bakteri hücrelerinde bulunan prokaryotik bir enzimdir. Aktif bölgesinde demir içeren dimerlerdir ve MnSOD'a benzer bir protein yapısına sahiptir. En son tanımlanan süperoksit dismutaz NiSOD'dur. Enzim *Streptomyces* bakterilerinden ve siyanobakterlerden izole edilmiştir. Yaklaşık 80.000 Dalton'luk moleküler ağırlığa sahip hegzamerik bir yapıdır. Her bir monomerik birim "nikel kanca" olarak adlandırılan bir yapı taşımaktadır (Abreu ve Cabelli, 2010). SOD enziminin  $O_2^{\cdot -}$ 'i etkili biçimde indirgemesine rağmen, reaksiyon ürünlerinden biri  $H_2O_2$ 'dir. Çoğu aerobik organizma ve tüm omurgalılarda  $H_2O_2$ 'in metabolize edilmesinden sorumlu iki enzim vardır. Bunlar katalaz ve glutatyon peroksidazdır (Lackner, 1998).

### 1.3.1.2. Katalaz

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) omurgalılarda 120.000 Dalton'luk moleküler ağırlığındadır. Her biri aktif bölgesinde bir ferrik hem grubu taşıyan dört alt birimden oluşmaktadır. Her alt birimde enzimi stabil tutmaya yardımcı olan bir NADPH bağlıdır. CAT enzimince katalizlenen reaksiyon SOD enziminde olduğu gibi bir dismutasyon reaksiyonudur (Lackner, 1998).



Katalaz aktivitesi azid veya siyanit ile inhibe olabilmektedir ancak en kullanışlı inhibitör aminotriazol'dür. Sabit  $\text{H}_2\text{O}_2$  kaynağı olduğunda CAT belirli peroksidaz türü reaksiyonları da gerçekleştirebilmektedir. CAT peroksizomlarda lokalize olmaktadır. Peroksizomlar yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyonunda fonksiyon görürler. Bu işlemde  $\text{H}_2\text{O}_2$  yan ürün olarak oluşmaktadır. Bu nedenle CAT peroksizomlarda hasarı ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'nin hücrede diğer bölgelere hareketini engellemektedir (Lackner, 1998).

### 1.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9), hidroperoksitlerin detoksifikasyonunda en önemli peroksidazdır.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve hidroperoksitlerin glutasyon bağımlı redüksiyonlarını katalizler.



Peroksitlerin redüksiyonu ile, GPx oksidatif hasar ve serbest radikal ürünlerin akümülyasyonuna karşı koruma sağlar. Sitoplazmada ve mitokondriyal matrikste yer almaktadır. Enzim aktif bölgesinde selenosistein içermektedir. Selenosistein sisteinin aminoasit analogudur ve selenyum atomu sülfürün yerini almaktadır. GPx tarafından katalizlenen reaksiyon bir peroksit substratın ilgili alkole indirgenmesidir. Reaksiyon sırasında redükte glutasyon (GSH), glutasyon disülfite (GSSG) oksitlemektedir. GPx enziminin radikal zincir reaksiyonunu sonlandırarak, membranların lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında önemli rol oynadığı düşünülmektedir (Lackner, 1998).

#### 1.3.1.4. Lipid Peroksidasyonu

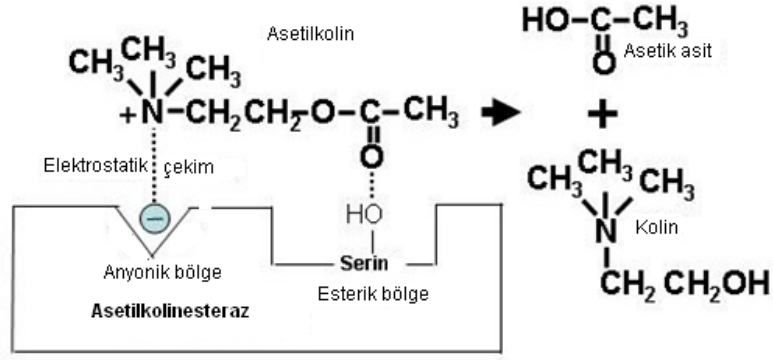
Oksidatif stres sırasında meydana gelen tipik reaksiyonlardan biri de doymamış yağ asitlerinde peroksidatif hasar olduğundan, lipid peroksidasyonu kimyasal kirleticiler tarafından indüklenen oksidatif stres etkilerine karşı markır olarak kullanılabilir (Pandey vd., 2003). Lipid peroksidasyonu üç aşamadan oluşmaktadır:

- **Başlama:** Bir lipidin poliansatüre yağ asidi reaktif bir serbest radikal ile reaksiyona girer ve bir lipid radikal oluşur. Oluşan lipid radikal daha sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek bir peroksilipid radikal oluşturur. Yüksek reaktivitesi nedeniyle HO<sup>•</sup> çift bağlara bağlanarak veya sistemden bir hidrojen atomu ayırarak poliansatüre yağ asitleriyle reaksiyona girer ve karbon merkezli bir radikal oluşturur.
- **İlerleme:** Peroksilipid radikal, lipid molekülünün başka bir poliansatüre yağ asidi ile reaksiyona girerek lipid hidroperoksit ve lipid radikal oluşturur. Lipid hidroperoksit radikaller başka bir lipid molekülünden hidrojen atomu ayırma yeteneğinde olduklarından, lipid peroksidasyonunun ilerlemesine neden olmaktadır.
- **Sonlanma:** Serbest radikallerin uzaklaştırıldığı aşamadır. İki radikal birleşerek radikal olmayan bir ürün oluşturmakta ve zincir reaksiyonu sonlanmaktadır.

Alkoksil ve peroksil radikaller hidrojen atomları ayırarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu stimüle edebilmektedirler. Ayrıca lipid hidroperoksit redükte metallerin veya askorbatın varlığında reaktif aldehit ürünlere (malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), 4-hidroksi-2-hekzenal) parçalanabilmektedir. MDA, polienik yağ asitlerinin peroksidatif parçalanma ürünüdür ve doku düzeyindeki artış lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Lipidlerin peroksidasyonu membran bütünlüğünü bozarak akışkanlık ve permeabilitede değişime, membrana bağlı enzimlerin inhibisyonuna neden olmaktadır (Horton ve Fairhurst, 1987; Wagner vd., 1994).

#### 1.3.2. Nörotoksisite

Asetilkolinesteraz, nörotransmitter asetilkolinin inaktif ürünleri olan kolin ve asetik aside hidrolitik parçalanmasından sorumludur (Şekil 1.3).



**Şekil 1.3.** Asetilkolinin hidrolitik parçalanması

(<http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase/images/acetylcholinesterase.png>)

Asetilkolin fizyolojik olarak önemli nörotransmitter ajanlardan biridir. Sinir impulslarının kolinerjik, sinaptik ve nöromusküler bağlantılarda efektör hücrelere transmisyonununun sorumludur. Bir sinir impulsu parasempatik bir nörona geldiğinde ve bir sinir sonuna ulaştığında, sinir ucunda veziküllerde depolanan asetilkolin sinaptik veya nöromusküler bağlantıya serbest bırakılmaktadır. 2 ila 3 milisaniye içinde salınan asetilkolin postsinaptik membranda asetilkolin reseptör bölgesi ile etkileşerek sinir lifinde veya kasta stimülasyona neden olmaktadır. AChE, bağlantı noktasında asetilkolin derişimini azaltmakta ve sinir iletimini düzenleyici bir ajan olarak fonksiyon görmektedir. Hidroliz ürünleri kolin ve asetik asit postsinaptik membranı stimüle etmemektedir (Fukuto, 1990).

AChE enziminin organofosforlu bir ester tarafından inhibisyonu, AChE'nin asetilasyonuna benzer şekilde enzimin aktif bölgesinde serin hidroksil kısmının fosforillendiği kimyasal bir reaksiyonla meydana gelmektedir. Asetillenen enzim hızla parçalanırken, fosforillenmiş enzim oldukça stabildir ve fosfor atomuna bağlanan gruplara bağlı olarak geri dönüşümsüz şekilde inhibe olmaktadır. Bir fosforil kısmı ile engellenen serin hidroksil grubu artık asetilkolin hidrolizine katılamaz (Fukuto, 1990).

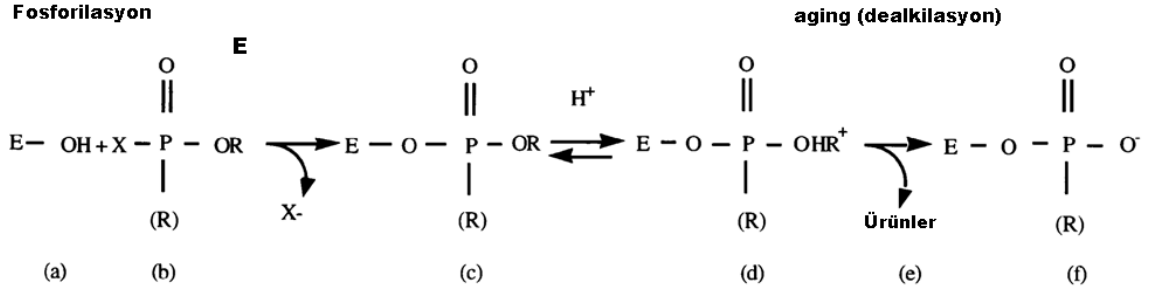
Organofosforlu bileşiklerin toksisite mekanizması, enzimin aktif bölgesinde asetilkolinesterazın geri dönüşümsüz inhibisyonuna dayanmaktadır. Bu asetilkolin akümülyasyonuna ve nöromusküler bağlantı noktalarında ve otonomik ve merkezi sinir sistemlerinde kolinerjik reseptörlerin aşırı uyarılmasına neden olmaktadır. AChE inhibisyonunun oranı ve derecesi organofosforlu bileşiklerin yapısına ve metabolitinin doğasına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak saf thion bileşikler orijinal formlarında kuvvetli inhibitörler değildir ve okson metabolitlerine metabolik

aktivasyona (oksidasyona) ihtiyaç duymaktadırlar (Paudyal, 2008).

İlk inhibisyondan ve enzim-organofosforlu bileşik kompleksi oluşuktan sonra, iki reaksiyon meydana gelebilmektedir (Şekil 1.4).

1- Enzimin kendiliğinden reaktivasyonu meydana gelebilir ancak enzim inhibisyonundan çok yavaştır ve saatler hatta günlerce sürebilmektedir. Bu rejenerasyon işleminin oranı, organofosforlu bileşiğin türüne bağlıdır. Genel olarak AChE-dimetil organofosfat kompleksi bir günden kısa sürede kendiliğinden yeniden aktive olabilirken, AChE-dietil organofosfat kompleksinin reaktivasyonu günler alabilir. Yeni sentezlenen enzimin yeniden inhibisyonu da meydana gelebilmektedir.

2- Zamanla, enzim-organofosfat kompleksi bir alkil grubu kaybeder ve aktive edici ajanlara artık yanıt vermez. Bu kademeli, zamana bağlı işlem “aging” (yaşlanma) olarak adlandırılmaktadır. Yaşlanma oranı pH, sıcaklık ve organofosfat türüne bağlıdır. Kendiliğinden reaktivasyon ne kadar yavaş ise, yaşlanma işlemi için mevcut inaktif AChE miktarı o kadar fazladır (Paudyal, 2008).



**Şekil 1.4.** AChE fosforilasyonu ve fosforile enzimin dealkilasyonu. (a) serbest enzim, (b) organofosfat, (c) kovalent fosforil eklentisi, (d) karbonyum arabileşik, (e) dealkilasyon ürünü (R-OH, R-türevli alkenler), (f) serinin monofosfat esteri (Masson vd., 1997).

Karbamatlı pestisitler de AChE'nin karbamilasyonu yolu ile enzimin aktivitesini inhibe etmektedirler. Organofosforlu pestisitlerin aksine, karbamatlar etki göstermek için biyolojik aktivasyona ihtiyaç duymadıklarından doğrudan inhibitörler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Ayrıca organofosfat-enzim kompleksinin aksine, karbamat esterleri metabolik olarak hidroliz edilerek enzim aktivitesi yeniden kazanılmaktadır. Bu nedenle karbamatlı pestisitlerin neden olduğu kolinesteraz inhibisyonu geri

dönüşümlüdür (Manahan, 2001).

### 1.3.3. Hematolojik Parametreler

Kan hücrelerinin hayati fonksiyonları ve kan dokusunun toksik maddelere duyarlılığı, hematopoetik sistemi hedef doku haline getirmektedir. Ksenobiyotik etkisinde kan hücrelerinde ve onların prekürsörlerinde doğrudan veya dolaylı olarak meydana gelebilecek hasarın sonuçları hayatı tehdit edicidir (Klaassen, 2001). Hematolojik parametreler kimyasal stresörlere yanıtlarında spesifik değildirler. Ancak araştırılan organizmanın genel fizyolojisi ve sağlık durumunu gösterdiğinden etki değerlendirme çalışmalarında önemli bilgiler sağlamaktadır (Van der Oost vd., 2003).

#### 1.3.3.1. Tam Kan Sayımı

Kan dolaşımında bulunan hücreler üç türdür: kırmızı kan hücreleri (eritrositler), beyaz kan hücreleri (lökositler) ve platelet (trombositler). Anormal biçimde yüksek veya düşük sayılar farklı hastalık formlarının varlığını gösterebilmektedir. Bu nedenle kan testleri toksik madde uygulanan organizmanın genel sağlık durumunun izlenmesinde, anemi ve enfeksiyon gibi durumların tanısında sıklıkla uygulanmaktadır. Tam kan sayımında belirlenen parametreler:

- **Eritrosit (RBC) sayısı:** Eritrositler büyük oranda hemoglobin içerirler. Hemoglobin moleküllerine akciğer ve solungaçlarda oksijen bağlanarak, dokulara oksijen taşınmaktadır. RBC sayısının düşük olması anemik durumun göstergesidir, dokular ihtiyaç duydukları oksijeni alamazlar. Yüksek RBC sayısı polisitemi göstergesidir. Hemoglobin oranı aynı kalmakta ancak dolaşımdaki eritrosit sayısı artmaktadır.

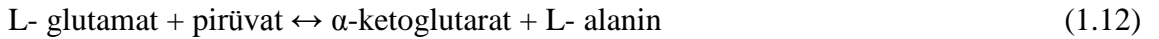
- **Eritrosit indeksleri:** Ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobin derişimi (MCHC)'dur. MCV, kırmızı kan hücrelerinin boyutunu gösterir. MCH değeri ortalama bir kırmızı kan hücresinin hemoglobin miktarıdır. MCHC eritrosit hemoglobin konsantrasyonunun yüzde olarak ifadesidir. Bu değerler farklı anemi türlerinin tanısında kullanılmaktadırlar.

- **Lökosit (WBC) sayısı:** Lökositler vücudu enfeksiyona karşı korurlar. WBC sayısı enfeksiyonun, kimyasala karşı alerjik yanıtın ve lösemi gibi çok sayıda durumun belirlenmesinde kullanılmaktadırlar.

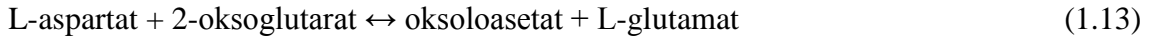
- **Trombosit sayısı:** Pıhtılaşmayı sağlayan hücrelerdir. Koagülasyon sistemi ve hemostaz bozukluklarının değerlendirilmesinde kullanılır.
- **Hemoglobin (Hb):** Kandaki toplam hemoglobin miktarını gösterir. Anemi, kan kaybı, polisitemi v.b. durumların değerlendirilmesinde kullanılır.
- **Hematokrit (HCT):** Kandaki hemoglobin ve eritrosit miktarını gösterir. Bir başka ifadeyle kanın şekilli elemanlarının tüm kana oranıdır. Hematokrit ve hemoglobin değerleri anemi veya polisitemi durumlarının araştırılmasında kullanılmaktadır (Mazza, 2002).

### 1.3.3.2. Biyokimyasal Kan Parametreleri

Aminotransferazlar bir amino asitin amino grubunu, koenzimin (pridoksal fosfat) pridoksal kısmına transfer ederek, pridoksamin fosfat oluşturmak suretiyle fonksiyon göstermektedirler. Koenzimin pridoksamin formu, daha sonra aminoasit oluşturmak üzere  $\alpha$ -keto asit ile reaksiyona girmekte ve koenzimin orijinal aldehit formunu yeniden oluşturmaktadır. Alanin aminotransferaz (ALT, EC 2.6.1.2), önceki adı ile glutamat pirüvat transaminaz, birçok dokuda bulunmakta ve alaninin amino grubunun  $\alpha$ -ketoglutarata transferini katalizleyerek pirüvat ve glutamat oluşturmaktadır. Reaksiyon geri dönüşümlüdür. Ancak aminoasit katabolizması sırasında enzim glutamat sentezinde fonksiyon görmektedir (Champe vd., 2005).



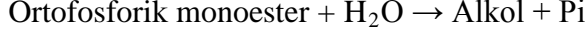
Aspartat aminotransferaz (AST, EC 2.6.1.1), ilk adı ile glutamat oksaloasetat transaminaz, aminoasit katabolizması sırasında glutamatın amino gruplarını oksaloasetata transfer ederek aspartat oluşturmaktadır. Katalizlenen reaksiyon geri dönüşümlüdür.



Aminotransferazlar intrasellüler enzimlerdir ve yüksek serum düzeyleri bu enzimlerce zengin olan hücrelerde hasar olduğunun göstergesidir. Serum ALT ve AST aktiviteleri hepatosellüler hasarın tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Birçok dokuda bulunmakla birlikte, hepatositlerdeki konsantrasyonları diğerlerine göre çok yüksektir. Bu nedenle membran permeabilitesini değiştiren bir durumda enzim serum içine sızmaktadır. Karaciğer hastalıklarında ALT, AST enzimine göre daha spesifik

olmakla birlikte, karaciğerdeki derişimi daha yüksek olduğu için AST daha duyarlıdır (Champe vd., 2005).

Alkalen fosfataz (ALP, EC 3.1.3.1), çinko ve magnezyum iyonları varlığında alkali pH'da fosfat esterlerinin birçok türünü hidroliz eden bir metalloenzimdir.



(1.14)

Başlıca karaciğer ve kemikte bulunmaktadır. Serum ALP aktivitesi akut ve kronik karaciğer hastalıklarında artabilir. ALT ve AST enzimlerinin aksine, ALP aktivitesinde artış hasarlı hücreden sızma yoluyla olmamaktadır. Safra akışının engellenmesi, hepatik ALP *de novo* sentezini uyarmakta ve yeni sentezlenen enzim dolaşıma katılmaktadır (Kaneko vd., 1997).

Pestisitlerin karbohidrat metabolizmasında yer alan karaciğer enzimlerinin aktivitelerini etkileyerek glikojen rezervlerini ve serum glukoz düzeylerini, protein sentezini etkileyerek protein miktarını değiştirebileceği bildirilmiştir (John, 2007; Sancho vd., 2000). Bu nedenle karakteristik olarak en sık değişen biyokimyasal kan parametreleri glukoz ve protein, test organizmasının genel sağlık durumunun ve metabolik düzensizliklerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Neff, 1985).

#### **1.3.4. Endokrin Parametreler**

Endokrin sistem, özelleşmiş bezlerden çok düşük miktarlarda salgılanarak kan dolaşımı ile hedef organ(lar)a taşınan organizmanın düzenleyici, büyüme-gelişme, homeostatik mekanizmalarını etkileyen hormonlardan oluşmaktadır. Organizmada hormonların dengesi (homeostazis) fonksiyonel düzensizlikleri engellemek için gerekmektedir (Lintelmann vd., 2003).

Endokrin bozulması hormonların üretimi, salınması, taşınması, metabolizması veya giderilmesini değiştiren eksojen bir ajanın faaliyeti olarak tanımlanmaktadır (EPA, 1997). Endokrin bozucu kimyasallar doğal ve sentetik hormonları, pestisitleri, plastik endüstrisinde kullanılan monomerleri ve katkı maddelerini, deterjan bileşenlerini, parçalanma ürünlerini ve kalıcı çevresel kirleticileri içermektedir. Pestisitlerin gonad gelişimini baskılayarak (Singh ve Canario, 2004), serum seks steroid düzeylerini değiştirerek (Maxwell ve Dutta, 2005) ve feminizasyon (Leanos-Castaneda vd., 2007)



yoluyla balıklarda endokrin bozucu etki gösterdikleri bilinmektedir.

Endokrin bozucuların etki mekanizmalarından biri agonistik veya antagonistik etki göstererek hormon reseptörleri ile doğrudan etkileşimlerdir. Eksojen agonist, reseptöre doğal substratı gibi bağlanarak, reseptörün aktivasyonu yoluyla endojen hormon ile aynı etkilere sebep olabilmektedir. Antagonistik mekanizmada, reseptör aktive edilemediğinden hormon yanıtları antagonist tarafından engellenmektedir. Reseptörün inhibisyonu rekabetçi olduğunda reseptör tamamen inaktif hale getirilmekte, rekabetçi olmadığına reseptör tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar yavaşlatılmaktadır. Kimyasallar hormon metabolizmasını farklı yollarla etkileyebilmektedirler. Önemli enzim katalizli reaksiyonların inhibisyonu ve induksiyonu ile hormon üretimi değiştirilebilmektedir. Belirlenen değişime göre etki östrojenik-androjenik veya antiöstrojenik-antiandrojenik olarak nitelendirilebilmektedir. Lipofilik bileşiklerin çok az bir kısmı kanda serbest halde, çoğu albumin ve globulinler gibi özel hormon taşıyıcı proteinlere bağlı halde bulunmaktadır. Seks steroidler ile taşıyıcı proteinlerin bağlanma bölgesi için rekabet eden kimyasallar serbest ve dolayısı ile etkili hormon düzeyini arttırabilmektedirler (Lintelmann vd., 2003).

Balıklarda endokrin sistem, vücutta lokalize olan çok sayıda biyolojik işlemi düzenlemek üzere, hormonları sentezleyen ve salgılayan bezlerden oluşur. Tiroid bezi balığın sıcaklık değişimlerine ve ozmotik strese adapte olmasını sağlayan tiroksin (T4) ve triiyodotironin (T3) hormonları salgılar. Hipofiz bezi büyüme, ozmoregülasyon, lipid metabolizması, reproduktif gelişme ve davranışı etkileyen aynı zamanda diğer endokrin bezleri de kontrol eden çok sayıda hormon salgılar (Bone vd., 1995).

Steroid hormonlar dört hidrokarbon halkasından oluşan sabit yapılardır ve ortak prekürsör olan kolesterolden farklı steroidojenik enzimlerce katalizlenen bir seri biyolojik aşama ile sentezlenmektedir. Kolesterolün iç mitokondri membranına transferini düzenleyen protein steroid sentezinde anahtar düzenleyici aşama olan steroidojenik akut düzenleyici proteindir (*StAR*). Kolesterol  $P_{450}$  enzimi ile 21 karbonlu bir steroid olan pregnenolona dönüştürülmektedir. Pregnenolon daha sonra bir seri izomerizasyon ve hidroksilasyon reaksiyonu geçirerek C-21 steroid hormonlar progestin ve glukortikoidleri oluşturmaktadır.  $17\alpha$ -hidroksiprogesteron androjenlere (C-19 steroidler) dönüştürülmektedir. Androjenler daha sonra aromataz enzim ( $P_{450}$  arom) ile östrojenlere (C-18 steroidler) çevrilmektedir. Seks steroidler ovaryumda teka ve granüloza

hücrelerinde, testislerde Leyding veya interstitial hücrelerde üretilmektedir. Karaciğer ve hipotalamus gibi uzak hedef dokular ile gonadlarda spesifik reseptörlere bağlanarak endokrin ve parakrin etki göstermektedirler (Thomas, 2008). Balıklarda testosteron (T) her iki eşeyde de bulunur. Dişi balıklarda başlıca seks steroid olan estradiol gelişen oosit foliküllerinde üretilir. Estradiolün rolü yumurta sarısı öncü lipofosfoprotein olan vitellojen sentezi için karaciğeri stimüle etmektir. Sentezlenen vitellojen daha sonra gelişen oosite katılır ve gonad ağırlığındaki temel artıştan sorumludur. Erkek balıklarda karaciğerde estradiol reseptörleri bulunur ve normalde estradiol bulunmamasına rağmen, östrojenik maddelerce vitellojen sentezi uyarılabilir (Kime, 2001).

Östrojen, 17 $\beta$ -estradiol ve testosteron gibi seks steroidler ve stres steroid olan kortizol, çevresel kirleticilerin uygulanmasını takiben anormal endokrin fonksiyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Seks ve stres steroidlerin serumdaki konsantrasyonları üç faktöre bağlıdır; sentez, bağlayıcı proteinlerce plazmada depolanma ve hepatik parçalanma. Sentez, hipotalamus-hipofiz (H-P) eksenini kontrolü altındadır. Dolayısıyla steroid taklitlerin veya antagonistlerin varlığı H-P ekseninde son ürün mekanizmasını etkileyerek serum steroid derişimlerini değiştirebilmektedir. Seks hormon bağlayan proteinler seks steroid stimülasyonunu takiben karaciğerde sentezlenmekte ve östrojen ve androjenlere karşı yüksek afinite göstermektedir. Bu proteinler plazmadaki serbest hormon miktarını azaltarak steroid hormonların hücreye girişini sınırlandırmaktadır. Bağlanma proteinlerine bağlı olan steroidler hepatositlerce parçalanmamaktadır. Steroid agonistleri veya antagonistleri serum bağlanma proteinlerinin sentezini değiştirerek steroid parçalanma aktivitesini de etkilemektedirler. Steroidler hepatositler tarafından parçalandığından bu aktiviteden sorumlu olan enzimdeki değişim dolaşımdaki steroid konsantrasyonunu değiştirmektedir (Guillette vd., 1999).

Memelilerde adrenal kortekse karşılık gelen interrenal bez balıklarda kortikosteroid hormonları (C-21 steroidler) salgılamaktadır. Kortizol, balıklarda temel kortikosteroiddir. Glukokortikoid ve mineralokortikoid hormon olarak fonksiyon görerek ara metabolizmayı ve elektrolit dengesini düzenlemektedir. Glukoneogenezis ile karaciğerden glukoz biyosentezinin düzenlenmesinde önemlidir. Çeşitli kirleticilerin etkisinde kortikosteroid homonlarda hızlı bir artış meydana gelmektedir. Kısa süreli ksenobiyotik etkisinde, metabolik rezervlerin üretimini arttırılması gibi hayatta kalmak için çok önemli olan adaptif yanıtları düzenlemektedir. Ancak kortizol seviyesinin

kirletici etkisinde uzun süreli indüksiyonu reproduktif ve immün fonksiyonları bozabilmekte ve protein katabolizmasını stimüle ederek gelişimi olumsuz etkileyebilmektedir (Thomas, 2008).

### **1.3.5. Organosomatik İndeks**

Organosomatik indeksler doku ağırlığının vücut ağırlığına oranıdır ve uygulanan ksenobiyotiğin hedef organdaki toksik etkileri ile doğrudan ilişkili olduklarından biyomarkır olarak kullanılmaktadırlar. Hepatosomatik indeks (HSİ) stres durumunda değişebilmekte ve karaciğere toksik olan maddeler için gösterge olarak kullanılmaktadır. Ksenobiyotik detoksifikasyonunu maksimum düzeye çıkarmak için karaciğerin boyutunun arttığı, buna karşın glikojen miktarının yüksek metabolik aktivite nedeniyle azalması sonucu hacim olarak küçüldüğü bilinmektedir. HSİ ayrıca yetersiz beslenmeden de etkilenmektedir. Gonadosomatik indeks (GSI) östrojenik aktiviteye sahip kirleticiler için uygun bir biyomarkırdır. Gonad gelişimi ve yumurtlamanın genel ölçüsü olarak kabul edilmekte ve reproduktif alanın bir parçası olarak kullanılmaktadır. Çünkü endokrin bozucu maddelerin bazı tiplerine yanıt olarak relatif gonad kütlelerinde azalma meydana gelebilir (Di Guilio ve Hinton, 2008).

### **1.3.6. Davranış**

Davranış, organizmaların gelişimsel sağlığını etkileyen genetik, biyokimyasal, fizyolojik ve çevresel özellikleri birleştirmektedir. Bu nedenle laboratuarda ölçülebilecek hücresel işlemler ile kirleticilere karşı ekolojik yanıtlar arasında bir bağlantı sağlamaktadır (Newman ve Unger, 2002).

Kirletici bileşenin engellenmesi, beslenme faaliyetinde değişiklikler, üreme ve yüzme gibi çeşitli davranışlar kimyasal uygulaması sırasında değerlendirilebilmektedir. Bu davranışsal yanıtlar vücut fonksiyonlarındaki iç düzensizliklerin göstergesi ve genellikle biyokimyasal, morfolojik veya fizyolojik sorunların toplam etkisidir. Bu nedenle akuatik organizmalarda toksik madde stresinin ekolojik olarak önemli ve duyarlı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Di Giulio ve Hinton, 2008).

### **1.3.7. Genotoksisite**

Genotoksisite genetik materyal DNA'nın yapısında veya fonksiyonunda meydana getirilen toksik modifikasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Baz kaybı, reaktif oksijen

türlerle oksidasyon veya DNA eklentisi oluşumu yoluyla baz yapısında modifikasyon meydana gelirken; DNA hasarı UV ışığının etkisi, DNA ipliklerinin çapraz bağlanması, DNA ve proteinler arasında çapraz bağlanma veya iplik kırığı yolu ile oluşmaktadır. DNA hasarının çevresel kirlenmelerin genotoksik özelliklerinin değerlendirilmesinde yararlı bir parametre olduğu kabul edilmektedir (Efferth ve Kaina, 2008).

Metabolik işlemler sırasında hücre içinde meydana gelen endojen veya eksojen kaynaklı ajanların DNA ile etkileşimi farklı DNA hasar türlerinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Replikasyon sırasında meydana gelen hatalar, yanlış ya da hasarlı nükleotidlerin eklenmesi veya DNA bazlarında kimyasal değişimler endojen kaynaklarla DNA hasarına örnektir ve hücrede toksik ve mutajenik sonuçları vardır (Shaughnessy ve DeMarini, 2009).

Normal aerobik metabolizma sırasında üretilen reaktif oksijen türleri nükleus ve mitokondri DNA'sına hasar verebilmektedir. Süperoksit radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) ve  $H_2O_2$ 'nin reaktivitelerinin düşük olmasına ve DNA'ya daha az zarar vermelerine rağmen,  $HO^{\cdot}$  prekürsörleri olarak önemli rol oynarlar. Ayrıca, üretilen  $H_2O_2$  hücrenin diğer bölümlerine difüze olabilir ve metal katalizli Fenton reaksiyonu ile asıl üretim merkezinden uzak bir konumda  $HO^{\cdot}$  üretebilmektedir. Oldukça reaktif olan  $HO^{\cdot}$ , timinin metil grubundan ve 2-deoksiribozun C-H bağından bir H atomu ayırarak DNA ile reaksiyona girmektedir. Pirimidinin C5-C6 çift bağına bağlanma C5-OH ve C6-OH eklenme radikalleri ve timinden H ayrılması allil radikali oluşturur. Timin ve sitozin ile etkileşerek sitozin ve timin glikoller dahil çok sayıda ürün vermektedir. Hidroksil radikalın C4, C5 ve C8 konumlarında guanin ve adenin rezidüleri ile reaksiyonu, 8-hidroksiguanin, 8-hidroksiadenin gibi hidroksillenmiş ve deamine edilmiş ürünler oluşturmaktadır. Reaktif türler ayrıca hücre membranında fosfolipidlerle etkileşerek siklik DNA eklentileri oluşturan reaktif aldehytlerin (MDA, 4-HNE) üretilmesine neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonu sonucunda endoplazmik retikulumun parçalanması sitoplazmaya  $Ca^{+2}$  iyonlarının geçişi ile sonuçlanmakta ve  $Ca^{+2}$  bağımlı endonükleazları aktive etmektedir (Cooke vd., 2003; Hermes-Lima, 2004).

DNA, elektrofilik alkilleyici ajanlarla kolayca reaksiyona giren elektronca zengin atomlara sahiptir. Alkilleyici maddeler metil, etil ve alkil gruplarını DNA'da elektronca zengin atomlara transfer ederler. Alkilasyon baz halkasının dışında azot ve oksijen atomlarında, baz halkasında deoksiriboza bağlı olanlar dışında kalan azot atomlarında ve

fosfat gruplarında köprü oluşturmamış oksijen atomlarında meydana gelmektedir. Alkilasyon hasarının sonuçları toksisite, mutajenisite ve klastojenisitedir (Tropp, 2008). Organofosforlu bileşikler reaktif oksijen türleri kaynağı olmalarının dışında, alkilleyici özelliklerinden dolayı DNA'ya hasar verebilen çevresel kirleticiler arasında yer almaktadır (Yaduvanshi vd., 2010).

Çoğu organik ksenobiyotik metabolik aktivasyon sonucu nükleik asitlere veya proteinlere bağlanarak kovalent eklentiler oluşturan elektrofilik metabolitlere dönüşmektedirler. DNA eklenti oluşumu DNA'nin bazlarından biri ile kimyasal arasında doğrudan bir kovalent bağlanmayı göstermektedir. DNA eklentileri onarılmazsa veya DNA replikasyonundan önce yanlış onarırsa, gen mutasyonlarına neden olabilir ve karsinogenezi başlatabilirler (Snodgrass, 2001).

Genotoksisite çalışmalarında kullanılan yöntemler, mevcut kirleticilerin ayrıntılı fiziksel ve/veya kimyasal özelliklerine gereksinim duymadan genotoksik etkiyi belirleme avantajına sahiptirler. Doğrudan DNA iplik kırıklarını veya sonrasındaki değişimleri belirleyen testler yaygın olarak kullanılmaktadır. İplik kırıklarının belirlenmesinde kullanılan ilk yöntemler santrifüj, filtreleme veya alkali şartlarda DNA çift ipliğinin ayrılması ve floresan boya ile boyanmasına dayanmaktadır. Alternatif yöntemler kardeş kromatid değişimleri ve mikronükleus testi gibi sitogenetik prosedürleri kapsamaktadır. Kardeş kromatid değişimi analizi, DNA iplik kırığını takiben kardeş kromatidler arasında kromozomal fragmentlerin değişimini belirleme yeteneğindedir. Mikronükleus testi hücre bölünmesinden sonra kardeş nükleuslara dahil olmayan kromozom fragmentlerini veya tüm kromozomların belirlenmesine dayanmaktadır. Bu tip bir hasar çekirdek dışında bir mikronükleus oluşumu ile sonuçlanmaktadır (Frenzilli vd., 2009).

DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biri tek hücre jel elektroforezi (comet) analizidir. İlk defa 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik, 1988 yılında Singh vd. (1988) tarafından modifiye edilerek alkali (pH>13) lizing koşullarında uygulanmıştır. Analiz (a) genotoksik hasarın tek hücre seviyesinde belirlenmesi, (b) çoğu ökaryot hücre tipinin analize uygun olması, (c) gerekli olan hücre sayısının az olması, (d) düşük maliyet, (e) uygulama kolaylığı ve (d) iplik kırıklarının belirlenmesinde kullanılan diğer yöntemlere göre daha hızlı ve duyarlı olması gibi avantajlara sahiptir (Tice vd., 2000).

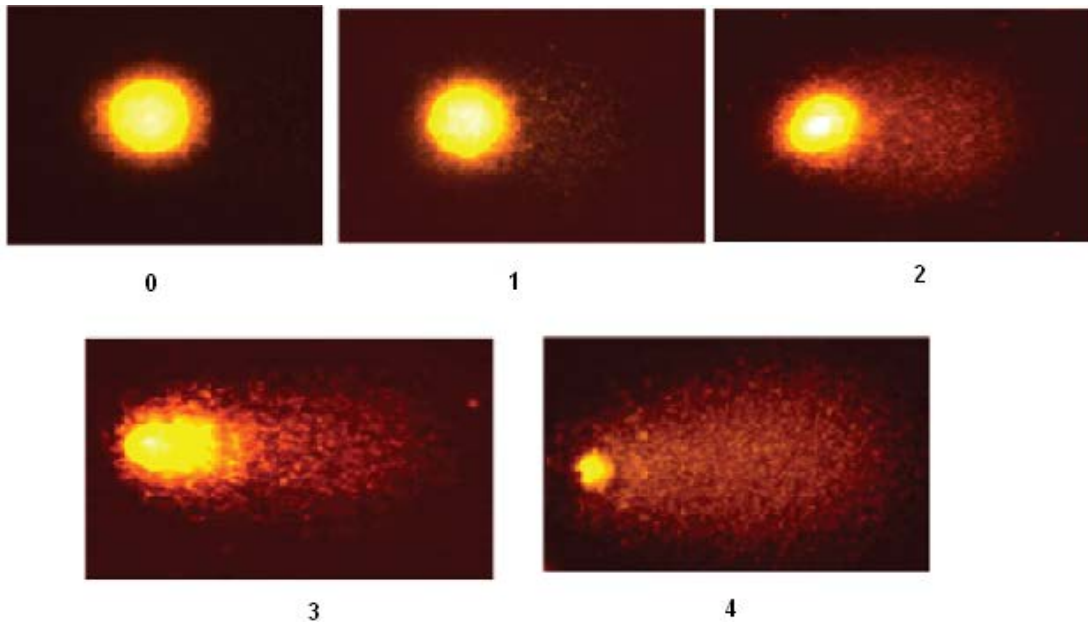
Farklı derecelerdeki hasarı gösteren cometleri insan gözü kolaylıkla ayırt eder. Görsel

değerlendirmeye göre cometler DNA göç uzunluğuna göre 5 kategoride tanımlanır (0-4).

Sınıflandırma cometlerin görünümüne göre aşağıdaki gibi gerçekleştirilir:

- Parlak başlı objeler ve görünmeyen kuyruklar 0 kategorisine girer (kuyuksuz spot şeklindeki görüntüler),

- Çok küçük başlı cometler ve uzun dağınık kuyruklar 4. kategoriye girer, 0-4 kategorileri arasında yer alan cometler kolaylıkla ayırt edilebilecek şekilde 1, 2 ve 3 kategorilerinde yer alır (Şekil 1.5). Sayma işlemi için her lamdan rastgele 100 comet seçilir ve her birine içinde buldukları kategoriye göre bir değer verilir (0, 1, 2, 3 veya 4).



**Şekil 1.5.** Görsel analizde comet kategorileri (Dinçer ve Kankaya, 2010).

Görsel değerlendirmeye ek olarak, floresan yoğunluğuna dayanan bilgisayarlı görüntü analiz sistemlerinin geliştirilmesi, %H-DNA ile % T-DNA (baş ve kuyruk kısmındaki DNA yüzdesi), kuyruk uzunluğu (TL,  $\mu\text{m}$ ), komet uzunluğu (LC,  $\mu\text{m}$ ), kuyruk momenti (TM, %T- DNA x TL,  $\mu\text{m}$ ) ve Olive kuyruk momenti (OTM, baş kısmının merkezi ile kuyruk kısmının merkezinin arasındaki mesafe farkının % T-DNA ile çarpımının 100'e bölünmesi ile elde edilen değerdir, arbitrary birim) gibi parametlerin belirlenmesi yoluyla DNA hasarının daha hassas düzeyde analiz edilmesine olanak sağlamıştır (Dikilitaş vd., 2009).

Bu tez çalışması ile araştırma kimyasal organofosforlu insektisit dimethoate'nin *O. mykiss* dokularında doz ve süreye bağlı olarak oksidatif, nörotoksik, hematolojik,

genotoksik etkileri ile endokrin bozucu potansiyeli ilk defa birlikte araştırılarak, kirleticinin toksisitesi hakkında daha fazla bilgi sağlanması ve dokuya özgü yanıtların tartışılması amaçlanmıştır. Oksidatif stres ve nörotoksosite çalışmaları karaciğer ve beyin dokularında antioksidan enzimler ile lipid peroksidasyonu ve AChE enzim aktivitelerinin saptanmasıyla araştırılmıştır. Hematolojik etkilerin belirlenmesinde tam kan sayımı ve biyokimyasal kan parametreleri değerlendirilmiştir. Pestisit endokrin sisteme etkisi steroid hormonların plazma düzeylerinin araştırılması ile yürütülmüştür. Kan örneklerinde test derişimlerinin *in vitro* uygulanmasıyla comet analizi kullanılarak DNA'ya olan etkisi belirlenmiştir.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR ÖZETLERİ

Pestisit kullanımının zararlıların kontrol edilmesinde yaygın olarak tercih edilen bir yaklaşım olmasına rağmen, bu tip kimyasalların çevredeki diğer türlere de toksik olduğu bilinmektedir. Gelişigüzel pestisit kullanımının neden olduğu çevre kirliliği ve hedef olmayan organizmalar için toksik riskleri dünya genelinde ilgi bulan bir konudur (Rao, 2006).

Çevre için tehdit oluşturan antropojenik ve doğal orijinli tüm kirleticilerin izlenmesi mümkün değildir. Sucul ortamın genel kalitesini değerlendirmek adına, organizmalarda kirlenme etkisinde fizyolojik değişimleri gösteren biyokimyasal yanıtların değerlendirilmesi daha verimli bir yaklaşımdır. Biyomarkırlar, organizmaların sağlık durumunu değerlendirmek ve çevresel risklere dair erken uyarı sinyallerini elde etmek için kullanılmaktadır (Payne vd., 1987). Toksik maddenin organizmaya girdiğini, dokular arasında dağıtıldığını ve kritik hedef bölgelerde toksik etkiye yol açtığını kanıtlayan duyarlı göstergelerdir (McCarthy ve Shugart, 1990).

Sucul organizmalar, karasal canlılara kıyasla kirlenme maruziyetine ve toksisiteye daha duyarlıdır. Bu açıdan kirlenme kaynaklı oksidatif stres, genotoksisite ve endokrin bozulması gibi olumsuz etkilerin hangi mekanizmalarla meydana geldiğinin ve sonuçlarının değerlendirilmesinde model sistemler olarak deneysel veri sağlayabilmektedirler (Lackner, 1998). Kimyasalların sınıflandırılması ve çevresel risk değerlendirmeleri için akuatik toksisite çalışmaları genel olarak balıklar, kabuklular ve sucul bitkilerde yapılan toksisite test verilerine dayanmaktadır (UNECE, 2004). Balıklar besin zincirindeki rolleri, toksik maddeleri biriktirme özellikleri ve düşük derişimde kirlenmeye yanıt verebilmeleri nedeniyle ekotoksikolojik çalışmalarda genellikle kullanılmaktadırlar. Balıkların test organizması olarak kullanıldığı toksisite çalışmaları laboratuarda veya arazide yürütülebilmektedir ve bireysel organizma temel çalışma birimidir. Belirlenen protokoller ile balıklarla laboratuvar testleri standart hale getirilmiştir ve arazi testlerindeki çevresel değişkenler nedeniyle kontrollü ortamda



yürütölme avantajına sahiptir (Rand, 2008).

Pestisitlerin neden olduğu çevre kirliliği balıklarda fizyolojik ve biyokimyasal değişimlere neden olmasının yanı sıra üreme ve metabolizma gibi fonksiyonları da etkileyebilmektedir (Braga da Fonseca vd., 2008). Farklı pestisit gruplarının, balıklarda neden oldukları olumsuz etkilerin akut ve kronik uygulamalar ile araştırıldığı çalışma örnekleri alt başlıklar halinde verilmektedir.

## 2.1. Oksidatif Stres

Pestisitlerin serbest radikal oluşumuna neden oldukları bilinmektedir. Bu nedenle farklı balık türlerinde pestisit indüklü toksisitenin biyomarkırları olarak antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimlerin ve lipid peroksidasyonunun doku spesifik incelendiği araştırmalar bulunmaktadır.

Organofosforlu pestisit dichlorvos'un *C. carpio* ve *Ictalurus nebulosus* Lesueur, 1819 karaciğer, böbrek, solungaç, kas ve beyin dokularında antioksidan enzimler ve diğer oksidatif ve redoks parametrelere etkisi araştırılmıştır. *C. carpio*'da SOD aktivitesi karaciğer ve beyin dokularında, GPx aktivitesi beyin dokusunda ve CAT aktivitesi karaciğer ve böbrek dokularında indüklenmiştir. *I. nebulosus*'ta SOD karaciğer ve kas dokularında artmış, GPx ve CAT aktiviteleri sadece karaciğer dokularında indüksiyon göstermiştir. *C. carpio* beyin dokusunda pestisit uygulaması sonrası lipid peroksidasyonunda belirlenen azalma, düşük  $O_2^-$  ve  $HO^\cdot$  düzeyleri ile açıklanmıştır. Araştırmacılar dichlorvos'un AChE inhibisyonuna ek olarak, oksidatif stres için karakteristik değişiklikleri de indüklediğini ve *I. nebulosus*'un *C. carpio*'ya göre bu değişimlere daha duyarlığını olduğunu bildirmişlerdir (Hai vd., 1997).

Sayeed vd. (2003) *Channa punctatus* Bloch, 1793 dokularında deltamethrin indüklü oksidatif stres ve bunun antioksidan enzimlere etkisini araştırmışlardır. Denemelerde pestisitinin 96 saat  $LC_{50}$  değerinin  $1/2$ 'si olan  $0.75 \mu\text{g/L}$ , 48 saat süreyle uygulanmıştır. Çalışılan tüm dokularda lipid peroksidasyonun istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı belirlenmiş ve karaciğer, böbrek ve solungaç dokuları için artış sırasıyla %39, %21 ve %182 olarak saptanmıştır. Karaciğer ve böbrek dokularında GPx aktivitesinin arttığı, solungaç dokusunda ise azalma gösterdiği bildirilmiştir. CAT aktivitesinde karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında sırasıyla %45, %43 ve %33 azalma olduğu belirtilmiştir. Pestisit absorpsiyonunda temel bölge olması ve düşük antioksidan

kapasitesi nedeniyle solungaç dokusunun diğer dokulara göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Tek doz, 96 saat uygulanan metil parathion'un *Brycon cephalus* Günther, 1869 karaciğer, kas ve solungaç dokularında CAT, GPx ve SOD enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonuna etkileri araştırılmıştır. SOD aktivitesinde karaciğer, kas ve solungaç dokularında sırası ile %34, %38 ve %28 artış olduğu ve CAT aktivitesinin sırasıyla %101, %154 ve %34 oranında indüklendiği saptanmıştır. Karaciğer dokusunda GPx aktivitesinde önemli bir değişim gözlenmezken, kas ve solungaç dokularında %36 ve %30 azalma belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu solungaç ve kas dokularında %67 ve %102 artmış, hepatik lipid peroksidasyonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Araştırmacılar, metil parathion'un oksidatif stresi indüklemeye potansiyeline sahip olduğunu ve araştırılan parametrelerin biyomarkör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Monteiro vd., 2006).

Peixoto vd., (2006) herbisit oxyfluorfen'in *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerine etkisini araştırmışlardır. Pestisit 0.3 ve 0.6 mg/L derişimleri 7, 14 ve 21 gün süre ile uygulanmıştır. CAT aktivitesinin uygulamanın 21. günü 0.6 mg/L derişim dışında, tüm gruplarda arttığı saptanmıştır. SOD aktivitesinde ise tüm derişimlerde ve sürelerde önemli bir inhibisyon belirlenmiştir.

*O. mykiss* karaciğer, solungaç ve kas dokularında antioksidan enzimlerin akut metil parathion ve diazinon uygulamasına yanıtları araştırılmıştır. Derişimler 0.5 ve 1 mg/L olarak belirlenmiş ve denemeler 24, 48 ve 72 saat sürdürülmüştür. Birlikte uygulanan pestisitlerin karaciğer ve kas dokularında MDA miktarında artışa neden olduğu, SOD ve GPx aktivitelerinin ise uygulama süresince artan ve azalan biçiminde dalgalanma gösterdiği bulunmuştur. Yüksek MDA miktarının pestisit indüklü serbest radikal üretiminden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Işık ve Çelik, 2008).

*Gambusia affinis* Baird ve Girard, 1853 96 saat süre ile 297 µg/L chlrorpyrifos etkisinde bırakılarak pestisit antioksidan enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonuna etkisi araştırılmıştır. CAT ve SOD aktivitelerinin sırası ile %77 ve %71 oranında inhibe olduğu ve lipid peroksidasyonunun indüklendiği bildirilmiştir. Yapılan 20 günlük depurasyon çalışmasında enzim aktivitelerinin kontrol düzeyine geldiği ve lipid peroksidasyonunda da önemli gerileme olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar yüksek lipid peroksidasyonu nedeniyle, reaktif oksijen türleri tarafından indüklenen hasarın

chlorpyrifosun toksik etkilerinden biri olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Kavitha ve Rao, 2008).

Dokuya özgü yanıtları değerlendirmek üzere Ballesteros vd. (2009) *Jenynsia multidentata* Jenyns, 1842 beyin, solungaç, karaciğer, bağırsak ve kas dokularında endosulfan'ın GPx ve CAT aktiviteleri ile lipid peroksidasyonuna etkisini araştırmışlardır. Endosulfan derişimleri 0.014, 0.072, 0.288 ve 1.4 µg/L olarak belirlenmiş ve 24 saat uygulanmıştır. GPx aktivitesinin karaciğer ve kas dokularında önemli oranda inhibe olduğu, solungaç dokusunda düşük derişimde indüklenirken yüksek derişimde azaldığı belirlenmiştir. Beyin dokusunda düşük derişimlerde bile GPx aktivitesinde artış belirlenmiş, bağırsaklarda yüksek derişimlerde aktivitede önemli azalma saptanmıştır. CAT aktivitesi sadece karaciğer dokusunda analiz edilmiş ve düşük derişimde değişim olmazken yüksek derişimlerde aktivitenin inhibe olduğu belirlenmiştir. Lipid peroksidasyonu karaciğer dokusunda yüksek derişimde, beyin dokusunda uygulanan tüm derişimlerde önemli düzeyde artış göstermiştir. Diğer dokularda lipid peroksidasyonunda önemli bir değişim gözlenmemiştir. Araştırmacılar oksidatif stresin endosulfan'ın toksisite mekanizmalarından biri olabileceği ve beyin dokusunun diğer dokulara nazaran oksidatif hasara daha duyarlı olduğu sonucuna varmışlardır.

Modesto ve Martinez (2010), akut roundup uygulamasının *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837 dokularında biyokimyasal biyomarkırlara etkisini araştırmak üzere, 6, 24 ve 96 saat süre 10 mg/L pestisit uygulaması yapmışlardır. Karaciğer dokusunda SOD aktivitesinde geçici bir azalma ve GPx aktivitesinde 6 ve 24 saatlerde önemli bir azalma belirlenmiştir. CAT aktivitesinde belirgin bir değişim olmazken, lipid peroksidasyonunun tüm uygulama sürelerinde arttığı saptanmıştır. Roundup uygulamasının biyotransformasyonu stimüle ettiği ve enzim aktivitelerinde inhibisyonla belirlendiği gibi antioksidan savunma sistemini baskıladığı kanıtlanmıştır.

## **2.2. AChE Aktivitesi**

Antikolinesteraz pestisitlerin akut toksisite mekanizması, AChE enzim aktivitesinin biyomarkır olarak maruziyet ve etkinin araştırılmasında yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur.

*Cirrhinus mrigala* Hamilton, 1822 dokularında fenvalerate'nin letal ve subletal

derişimlerinin AChE aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Pestisit 96 saat LC<sub>50</sub> değerinin 1/10'u olan 0.6 µg/L 1, 5, 10, 15 ve 20 gün süre ile uygulanmıştır. Enzim inhibisyonunun en fazla beyin dokusunda belirlendiği ve onu karaciğer, solungaç ve kas dokusunun takip ettiği bildirilmiştir. En yüksek yüzde inhibisyon uygulamanın 4. günü beyin dokusunda %22.7 ve minimum inhibisyon uygulamanın 1. günü solungaç dokusunda %0.75 olarak saptanmıştır. Ortalama AChE inhibisyonunun beyin, karaciğer, kas ve solungaç dokularında sırasıyla %13, %7.9, %6.2 ve %4 olduğu saptanmıştır (Mushigeri ve David, 2005).

*Oreochromis mossambicus* Peters, 1852 monocrotophos'un subletal derişiminin etkisinde 30 gün süre ile bırakılmış ve uygulama sonrası 7 gün depurasyon çalışması yapılmıştır. Pestisit LC<sub>50</sub> değerinin 1/10'u olan 1.15 mg/L test derişimi olarak belirlenmiş, uygulamanın 3, 7, 15 ve 30. günlerinde ve depurasyon çalışmasından sonra AChE aktivitesini belirlenmek üzere doku örnekleri alınmıştır. Beyin, solungaç ve kas dokularında AChE enzim aktivitesinin uygulama süresi ile paralel olarak azaldığı saptanmıştır. Belirlenen maksimum inhibisyon oranları beyin, solungaç ve kas dokuları için sırasıyla %65, %73 ve %66 olarak belirtilmiştir. Yedi gün depurasyondan sonra enzim aktivitesinin kontrol düzeyinin altında olduğu, inhibisyon oranının dokularda %9-32 arasında devam ettiği bildirilmiştir (Rao, 2006).

*Rhamdia quelen* Quoy ve Gaimard 1824 dokularında clomazone uygulamasının AChE aktivitesine etkisi araştırılmıştır. Balıklar 12, 24, 48, 96 ve 192 saat süresince 0.5 mg/L ve 1.0 mg/L pestisit derişimlerinin etkisinde bırakılmıştır. Uygulama sonrası 192 saat depurasyon çalışması uygulanmıştır. Pestisit uygulamasının her iki dokuda da yüksek derişimlerde enzim aktivitesinde önemli inhibisyona neden olduğu belirlenmiş ve inhibisyon yüzdeleri beyin ve kas dokuları için sırasıyla %47 ve %45 olarak verilmiştir. Depurasyon periyodunda aktivitenin büyük oranda geri kazanıldığı bildirilmiştir (Crestani vd., 2007).

Braga da Fonseca vd. (2008) herbisit 2.4-D'nin *Leporinus obtusidens* Valenciennes, 1836 dokularında AChE aktivitesine ve metabolik parametrelere etkisini araştırmışlardır. Balıklar 96 saat süre ile pestisit 1 ve 10 mg/L derişimlerine maruz bırakılmıştır. AChE aktivitesinin kas dokusunda her iki uygulama derişiminde de önemli oranda inhibe olduğu, beyin dokusunda ise sadece 10 mg/L derişimde inhibisyon belirlendiği bildirilmiştir. Protein miktarının karaciğer dokusunda azaldığı, kas dokusunda ise

yüksek derişimde arttığı saptanmıştır. Araştırmacılar pestisitlerin kas AChE inhibisyonu ile sinir kas iletimini etkileyebileceğini belirtirken, hiç bir davranış anormalliği gözlemediklerini eklemiştir.

Birlikte uygulanan clomazone ve propanil'in *L. obtusidens* AChE aktivitesi ve lipid peroksidasyonuna etkileri araştırılmıştır. Uygulama süresi 90 gün ve test derişimleri clomazone ve propanil için sırasıyla 376 µg/L ve 1644 µg/L olarak seçilmiştir. AChE spesifik aktivitesinin beyin dokusunda %53-56 ve kas dokusunda %30-60 oranında inhibe olduğu saptanmıştır. Lipid peroksidasyonunda analiz edilen tüm dokularda azaldığı belirlenmiştir (Moraes vd., 2009).

Wang vd. (2009) karmabatlı pestisit propoxur'un tek başına ve karmabatlı pestisit isoprocab ve organofosfat chlorpyrifos ile birlikte *Carassius auratus* Linnaeus, 1758 dokularında AChE aktivitesine etkisini araştırmışlardır. Denemelerde balıklar pestisitlerin LC<sub>50</sub> değerlerinin 1/256, 1/128, 1/64, 1/32 ve 1/16'sına karşılık gelen derişimlerin etkisinde bırakılmıştır. AChE aktivitesinin 5 günlük uygulamadan sonra tüm propoxur derişimlerinde önemli oranda inhibe olduğu, inhibisyon oranının %85-88 arasında olduğu bildirilmiştir. Ancak derişim arttıkça inhibisyon oranında azalma olduğu belirlenmiştir. Propoxur/isoprocab karışımı uygulanan gruplarda 5 günlük uygulama sonrasında enzim aktivitesinde inhibisyon belirlenmiştir. Beyin ve kas dokularında inhibisyonun pestisit derişimi ile orantılı olarak arttığı ve özellikle kas dokusunda derişim yanıt ilişkisinin olduğu bildirilmiştir. Üç pestisitlerin birlikte uygulandığı gruplarda beyin ve kas AChE enzim aktivitesinin tüm derişimler için uygulama süresine yanıt olarak azalmaya devam ettiği ve zamana bağlı bir inhibisyon gösterdiği saptanmıştır.

### **2.3. Kan Parametreleri**

Organizmadaki fizyolojik ve patolojik değişimlerin göstergesi olarak toksikolojik ve çevresel izleme çalışmalarında kan yoğunlukla çalışılmaktadır. Pestisitlerin balıklarda kan parametrelerine etkileri ile ilgili farklı araştırmalar mevcuttur.

Das ve Mukherjee (2000), quinalphos'un *Labeo rohita* Hamilton, 1822'de hematolojik parametreler üzerine etkisini araştırmışlardır. Uygulama derişimleri olarak pestisitlerin 96 saat LC<sub>50</sub> değerinin 1/10 ve 1/50'sine karşılık gelen 0.22 mg/L ve 1.12 mg/L derişimler 15, 30 ve 45 gün süre ile statik test ortamında uygulanmıştır. Serum protein miktarının her iki derişimde de 45 günlük uygulama sonrası azaldığı, en yüksek azalmanın %53.03

oranında hesaplandığı bildirilmiştir. Serum glukoz miktarının tüm uygulama sürelerinde ve derişimlerde arttığı maksimum artışın %33.56 olarak bulunduğı bildirilmiştir. Hemoglobin miktarının her iki derişimde de tüm sürelerde azaldığı, en yüksek azalma oranının %38.33 olduğı belirtilmiştir. Toplam eritrosit sayısının sadece uygulamanın 30 ve 45. günlerinde azaldığı, toplam lökosit sayısının ise tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli bir artış gösterdiği saptanmıştır. Aynı araştırmacılar cypermethrin'in *L. rohita*'da kas ve kan biyokimyasal parametrelerine etkisini incelemişlerdir. Uygulama periyodu 15, 30 ve 45 gün olarak belirlenmiş ve test derişimleri olarak pestisit 96 saat LC<sub>50</sub> değeri olan 0.139 mg/L'nin 1/10 ve 1/50 değeri seçilmiştir. Kas dokusu protein miktarında artan azalan şeklinde bir değişim olduğı ve istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Kan toplam serum proteininin her iki derişimde de uygulamanın 30 ve 45. günlerinde önemli oranda azaldığı belirtilmiştir. Kan glukoz miktarında uygulamanın 30 ve 45. günlerinde belirgin artış tespit edilmiştir. Eritrosit sayısının uygulama sonrası azaldığı, lökosit sayısının tüm uygulama sürelerinde artış gösterdiği belirtilmiştir. Hemoglobin miktarında 45. gün sonunda önemli azalma belirlenmiştir (Das ve Mukherjee, 2003).

Adhikari vd. (2004), *L. rohita*'da cypermethrin ve carbofuran'ın hematolojik parametreler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Cypermethrin için 0.16, 0.40 ve 0.80 µg/L ve carbofuran için 0.06, 0.15 ve 0.30 mg/L derişimler 28 gün süre ile uygulanmıştır. Eritrosit sayısının, hemoglobin miktarının ve hematokritin kontrol grubuna göre her iki pestisit uygulamasında da önemli düzeyde azaldığını, lökosit sayısının ise arttığını belirlemişlerdir.

Benomyl'in biyokimyasal kan parametreleri ve hematolojik indekslere etkisini araştırmak üzere, *O. niloticus* 5 hafta pestisit 100, 200 ve 400 µg/L derişimlerinin etkisinde bırakılmıştır. RBC sayısının ve hematokrit düzeyinin 3 hafta uygulama sonrasında önemli oranda azaldığı, hemoglobin, MCV, MCH ve MCHC değeri belirlenmesinde belirgin bir değişimin olmadığı bildirilmiştir. Plazma toplam protein miktarında değişim olmazken, glukoz miktarının uygulamanın ilk 3 haftası sadece yüksek derişimde sonraki periyotlarda tüm uygulama gruplarında arttığı bildirilmiştir (Min ve Kang, 2008).

Akut toksisite testleri ve hematolojik parametrelerin analiz edilmesiyle, diazinonun *Clarias gariepinus* Burchell, 1822'de toksik etkileri araştırılmıştır. Pestisit test organizmasında 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 6.6 mg/L olarak belirlenmiş, test derişimi olarak 9.4

mg/L 96 saat süresince uygulanmıştır. Eritrosit, WBC, Hb, hematokrit ve lökosit sayısının önemli düzeyde azaldığı, MCV, MCH ve MCHC değerlerinin kontrole göre değişmediği saptanmıştır. Araştırmacılar diazinonun hematopoezi bozduğunu ve balığın spesifik olmayan immünitesini azalttığını ileri sürmüşlerdir (Adedeji vd., 2009).

Atrazine'nin 24 saat LC<sub>50</sub> değeri olan 18.5 mg/L etkisinde bırakılan *C. carpio*'da pestisit akut etkileri araştırılmıştır. Kontrol grup ile karşılaştırıldığında, RBC sayısının %63.17, hemoglobinin %27.35, plazma glukoz miktarının %6.78 ve protein miktarının %18.73 oranında azaldığı saptanmıştır. WBC sayısının %3.73 arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmiştir. Çalışılan parametrelerin balıklarda patolojik durumları değerlendirmek için kullanılabileceği önerilmiştir (Ramesh vd., 2009).

Pestisit etkisinde farklı balık türlerinde aminotransferaz ve alkalin fosfataz aktivitelerinde artış olduğu bildirilmiş ve artış doğrudan pestisit karaciğer üzerindeki toksik etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Agrahari vd., 2007; John 2007).

*C. batrachus* karbamatlı bir pestisit olan carbaryl ve organofosfat phorate'nin subletal derişimlerine 24, 72, 120 ve 168 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Pestisitlerin 96 saat LC<sub>50</sub> değerlerinin 1/3'ü hesaplanarak belirlenen 0.27 mg/L ve 15.3 mg/L derişimler sırasıyla carbaryl ve phorate için uygulanmıştır. Serum glukoz miktarının uygulama süresince arttığı ve pestisit indüklü hipergliseminin toksik stres altında enerji ihtiyacını karşılamak için fizyolojik bir yanıt olduğu belirtilmiştir. ALP enzim aktivitesinin arttığı saptanmış ve bu artışın karaciğerde hücre nekrozu veya yüksek osteoblastik aktiviteden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Jyothi ve Narayan, 1999).

*C. carpio*'da cypermethrin uygulamasının protein metabolizmasının farklı parametrelerine etkisini araştırmak amacıyla, balıklar 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile 1.2 µg/L pestisit etkisinde bırakılmıştır. Solungaç, beyin, karaciğer ve kas dokularında uygulama süresi ile doğru oranlı olarak ALT ve AST enzim aktivitelerinin arttığı ve protein miktarının azaldığı saptanmıştır. Cypermethrin indüklü stres ile mücadele nedeniyle artan enerji talebini karşılamak için protein katabolizmasının uyarılmış olabileceği ve bu yanıtın artan ALT ve AST aktiviteleri ile desteklendiği bildirilmiştir (David vd., 2004).

*R. quelen* 2, 4 ve 8 gün süre ile cypermethrin'in 48 saat LC<sub>50</sub> değerinin %30 ve %45'i

olan 0.08 ve 0.12 mg/L derişimlerin etkisinde bırakılarak serum biyokimyasal parametreler araştırılmıştır. Pestisit uygulamasının glukoz, ALP ve AST enzim aktivitelerinde artış ve protein miktarında azalma ile sonuçlandığı, yüksek derişimde ALT aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar serum biyokimyasal parametrelerin pestisit zehirlenmesinin erken evrede belirlenmesinde kullanışlı olduğunu belirtmişlerdir (Borges vd., 2007).

Soufy vd. (2007), *O. niloticus*'ta kronik carbofuran uygulamasının kan biyokimyasal parametreler üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, balıkları 8 hafta süresince pestisit LC<sub>50</sub> değerinin 1/10'u olan 0.04 mg/L etkisinde bırakmışlardır. ALT, AST ve ALP enzim aktivitelerinde sırasıyla 3 ve 4 hafta uygulamalar sonrasında önemli bir artış belirlenirken, devam eden haftalarda enzim aktivitelerinin azaldığı saptanmıştır. Araştırmacılar yüksek serum transaminaz aktivitelerinin doğrudan hepatik toksisite ile ilişkili olduğunu ve bulguların uygulama süresi ile paralel ilerleyen karaciğer nekrozu ile desteklendiğini bildirmişlerdir.

Velisek vd. (2008), ergin *O. mykiss*'te herbisit metribuzin'in etkilerini değerlendirmek amacıyla, 96 saat süre ile 89.3 mg/L derişimde pestisit uygulaması yapmışlardır. Kontrol grup ile karşılaştırıldığında akut pestisit uygulamasının eritrosit sayısını, lökosit sayısını ve hematokrit miktarını önemli düzeyde azalttığı ve eritrosit hemoglobininde artışa neden olduğu saptanmıştır. Biyokimyasal kan parametrelerinden toplam protein, AST ve ALP enzim aktivitelerinde azalma belirlenirken, kortizol miktarı ve ALT aktivitesinde belirgin bir değişim olmadığı belirtilmiştir.

#### **2.4. Davranış**

Davranış bir organizmanın değişen ortamda hayatta kalabilmek için iç ve dış uyaranlara kendini adapte edebilmesine olanak sağlamakla birlikte çevresel değişkenlere karşı geliştirilen adaptasyonların da bir sonucudur. Bu nedenle kirleticilerin etkilerini değerlendirmek ve ayırt etmek üzere tanısal bir araç olarak toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Dutta, 1996).

Lindane'nin akut toksisitesini belirlemek amacıyla, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 ve 5 mg/L pestisit derişimlerine maruz bırakılan *O. niloticus*'ta aşırı mukus salgısı, solunum güçlüğü ve yüzgeç titremesi, S şeklinde kasılma ve agresiflik gibi anormal davranışlar bildirilmiştir. Gözlenen etkilerin doz ve süreye bağlı olarak arttığı belirtilmiştir (Al-



Kahem, 1996).

Fernandez-Vega vd. (2002), thiobencarb'ın *Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758'de toksik etkilerini araştırmak amacıyla, balıkları 96 saat süresince pestisit 0.22 mg/L derişimi etkisinde bırakmışlardır. Uygulamayı 192 saatlik bir depurasyon çalışması takip etmiştir. Balıklarda ilk gözlenen davranış değişikliğinin denge kaybı ve operkulum hareketinde hızlanma ile gözlenen solunum artışı olduğu ve bunu akvaryum tabanında hareketsiz kalma, kas zayıflığı ve kontrolsüz yüzme davranışlarının takip ettiği bildirilmiştir. Araştırmacılar 8 günlük depurasyon periyodunda da anormal davranışların devam ettiğini belirtmişlerdir.

Organoklorlu pestisit endosulfanın *Monopterus albus* Zuiew, 1793'te 96 saat LC<sub>50</sub> değeri belirlenmiş ve uygulama sırasında balıkların davranışları ve deride renk değişimi izlenerek kaydedilmiştir. Pestisit denge kaybına, düzensiz yüzme, ani titreme ve uyuşukluğa neden olduğu saptanmıştır. Endosulfan indüklü nörotoksisitenin gözlenen anormal davranışların kaynağı olabileceği belirtilmektedir (Siang vd., 2007).

Chlorpyrifos'un akut etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, *C. carpio* 1, 7 ve 14 gün süre ile 0.0112 mg/L ve 0.0224 mg/L derişimlerde pestisit etkisinde bırakılmış, uygulamadan sonra 14 gün depurasyon çalışması uygulanmıştır. Denemeler süresince davranışları izlenen balıklarda düzensiz ve ani yüzme hareketleri, yem yememe, kasılma, denge kaybı, aşırı mukus salgısı ve akvaryum tabanında hareketsiz kalma gibi belirtiler gözlenmiştir. Davranış anomalileri depurasyon aşamasında da gözlenmiş ve bu durum dokularda biriken chlorpyrifosun biyotransformasyon ürünü chlorpyrifos okson tarafından beyin ve kas dokularında AChE aktivitesinin inhibisyonu ile açıklanmıştır (Halappa ve David, 2009).

## **2.5. Endokrin Bozulması**

Kirleticilerin hormonların sentezini ve fonksiyonunu değiştirerek reproduktif sistem üzerinde olumsuz etkilerinin olabileceği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Hormonların sentezinde, salınmasında ve parçalanmasında rol oynayan reseptörlerin ve enzimlerin benzerliği nedeniyle, hiçbir endokrin sistem endokrin bozucu kimyasallara karşı duyarsız değildir. Bu nedenle bu kimyasalların etki mekanizmalarını ve olası sonuçlarını aydınlatmak üzere araştırmalar yapılmıştır.

*Heteropneustes fossilis* Bloch, 1794'te 0.5-2 mg/L karbamatlı bir pestisit olan

carbofuran uygulamasının yumurtlama öncesi dönemde vitellojen miktarını azaltırken, yumurtlama döneminde değişime neden olmamıştır. Pestisit uygulaması iki dönemde de balıklarda serum ve gonadda estradiol düzeyini önemli düzeyde azaltmıştır. Serumda ve gonadda estradiol düzeyindeki ve dolayısıyla vitellojen miktarındaki azalmanın CYP1A1 indüksiyonundan kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Çalışma sonuçları doğrultusunda araştırmacılar carbofuranın hipofiz-gonad eksenini hedefleyerek balıkta antiöstrojen olarak endokrin bozucu bir ajan olduğu sonucuna varmışlardır (Chatterjee vd., 2001).

Ergin dişi ve erkek *C. auratus*, 21 gün süreyle atrazine'nin iki farklı derişimi (100 ve 1000 µg/L) etkisinde bırakılmış ve plazma seks steroidleri belirlenerek pestisit steroidogenezis üzerine etkisi araştırılmıştır. Üç haftalık pestisit uygulaması sonrasında pestisit GSİ üzerinde doz veya süreye bağlı bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Erkek balıklarda yüksek dozlarda plazma testosteron seviyesinin azaldığı, estradiol miktarının ise her iki derişimde de belirgin oranda arttığı bildirilmiştir. Dişi balıklarda plazma testosteron ve estradiol miktarında değişim olmadığı saptanmıştır. Estradiol/testosteron oranının erkek balıklarda doza bağlı olarak arttığı belirtilmiştir. Araştırmacılar erkek balıklarda estradiol artışı ile birlikte meydana gelen testosteron miktarının azalmasını atrazine'nin steroid hormon biyosentezini etkilemesi şeklinde açıklamış ve pestisit steroidogenezisi bozduğunu ileri sürmüşlerdir (Spano vd., 2004).

Dişi ve erkek *H. fossilis*'te pestisit  $\gamma$ -hegzaklorosiklohegzan'ın (HCH) endokrin bozucu etkileri araştırılmıştır. Denenecek derişimler 0.1, 1.0 ve 10 mg/L olarak belirlenmiş ve uygulama 4 hafta sürdürülmüştür. Erkek balıklarda plazma testosteron ve 11-ketotestosteron ve dişilerde plazma testosteron ve estradiol düzeylerinde tüm uygulama derişimlerinde önemli azalma belirlenmiştir. Uygulamanın her iki eşeyde de yüksek derişimlerde GSİ'nin azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Pestisit hipotalamus-gonad eksenini ya da doğrudan hepatik ve steroidogenik enzimleri etkileyerek reproduktif endokrin bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir (Singh ve Canario, 2004).

Diazinon'un *L. macrochirus*'da endokrin sisteme etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 60 µg/L pestisit 2 hafta süresince uygulanmıştır. Histopatolojik incelemede ovaryumlarda nekroz belirlenirken serum estradiol seviyesinin kontrol grubuna göre azaldığı bazı gruplarda belirlenebilir sınırın altında olduğu saptanmıştır. Meydana gelen bu etkiler pestisit hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini etkilediğini, ovaryumlarda

meydana gelen hasarın normal düzeyde estradiol üretimini engellediği rapor edilmiştir (Maxwell ve Dutta, 2005).

DDT'nin ergin erkek *O. niloticus*'ta serum estradiol ve testosteron miktarlarını istatistiksel olarak önemli düzeyde azalttığı bulunmuştur. Araştırmacılar DDT'nin östrojen reseptöre bağlanarak östrojenik aktivite gösterdiğini ve endokrin sistemi bozduğunu ileri sürmüşlerdir (Leanos-Castaneda vd., 2007). Yi vd. (2007) uzun süreli alachlor uygulamasının *C. auratus*'ta serum seks steroidler ve gonadosomatik indekslere etkisini araştırmışlardır. 1, 4, 16, 63, 250 ve 500 µg/L alachlor derişimleri 60 gün süre ile uygulanmıştır. Testosteron seviyesinde önce doza bağlı olarak azalan daha sonra artan bifazik bir değişim gözlenmiştir. En belirgin azalmanın 16 µg/L derişimde %96 oranında meydana geldiği belirtilmektedir. Alachlor 17β-estradiol seviyesinde artışa neden olmuş ve maksimum artış 250 µg/L derişimde %1.2 oranında belirlenmiştir. Denemelerin sonunda, kontrol ve deney grubu arasında vücut ağırlığı veya uzunluğu açısından önemli bir farklılık saptanmamıştır. GSİ ve HSI değerlerinin tüm derişimlerde önemli oranda azaldığı saptanmıştır.

*H. fossilis*'te cypermethrinin reproduktif fizyolojiye etkisini araştırmak amacıyla, balıklar pestisitinin 96 saat LC<sub>50</sub> değerinin 1/5'i olan 0.02 mg/L derişim etkisinde 45 gün süre ile bırakılmışlardır. Her iki eşeyde de GSİ'nin azaldığı bildirilmiş ayrıca plazma 17β-estradiol ve 11-ketotestosteron düzeylerinde azalma saptanmıştır. Cypermethrin'in hipotalamus hipofiz gonad eksenini etkileyerek üremeyi inhibe ettiği, bu mekanizmanın folikül duvarının ve spermatojenik hücrelerin bozulduğunun kaydedildiği histolojik gözlemlerle de doğrulandığı bildirilmiştir (Singh ve Singh, 2008).

Zhang ve Hu (2008) DDT metaboliti *p,p*-DDE'nin erkek *Oryzias latipes* Temminck ve Schlegel, 1846'da gonad gelişimine etkisini araştırmışlardır. Uygulama 1, 5, 20 ve 100 µg/L derişimlerde iki ay sürdürülmüştür. Pestisit uygulamasının HSI'in artmasına ve GSİ'in azalmasına neden olduğu belirlenmiş ve *p,p*-DDE'nin antiandrojenik aktivite gösterdiği ileri sürülmüştür.

Tian vd. (2010a) organofosforlu pestisit monocrotophos'un dişi *C. auratus*'ta reproduksiyona etkisini araştırmak amacıyla, balıkları 21 gün süre ile yarı statik test şartlarında 0.01, 0.10 ve 1.00 mg/L pestisit etkisinde bırakmışlardır. Düşük derişimlerde GSİ'de değişim olmazken, yüksek derişimde kontrole göre önemli artış olduğu saptanmıştır. 17β-estradiol düzeyinin 0.10 ve 1.00 mg/L derişimlerde arttığı, testosteron

miktarının ise yüksek derişimlerde istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca pestisit uygulamasından sonra estradiol/testosteron oranında doza bağı bir artış olduğu belirtilmiştir. Pestisit etkisinde estradiol indüksiyonu ile ovaryum gelişiminin stimüle edildiği ve bu sonucun GSİ değerindeki artışla doğrulandığı belirtilmiştir. Monocrotophos uygulamasının gonad aromataz anlatımını etkileyerek testosteronun estradiole dönüşümünü arttırdığı, estradiol/testosteron oranında belirlenen artışın bu mekanizmadan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Araştırmacılar belirlenen bu değişimlerin reproduktif davranış, kapasite ve ikincil eşey karakterlerde etkilerinin belirlenmesi için ek çalışmaların gerektiğini belirtmişlerdir. Aynı çalışmayı erkek *C. auratus*'ta ile tekrarlayan araştırmacılar pestisit uygulamasının 17β-estradiol miktarını tüm derişimlerde arttırdığını saptamışlardır. Testosteron miktarında önemli bir azalma belirlenmiş, en yüksek pestisit derişiminde testosteron miktarının belirleme sınırının altında olduğu bulunmuştur. Estradiol/testosteron oranında doza bağı bir artış olduğu belirtilmiştir. Monocrotophos'un endojen estradiol miktarını artırıp vitellojenin sentezini ve sekresyonunu uyararak erkek *C. auratus* örneklerinde östrojenik aktivite gösterdiği ileri sürülmüştür (Tian vd., 2010b).

## 2.6. Genotoksisite

Çevresel kirleticilerin genotoksik etkileri *in vitro* ve *in vivo* biyomarkır analizleri ile izlenebilmektedir. Pestisitlerin DNA iplik kırığı (Whitehead vd., 2004; Pandey vd., 2006; Ali vd., 2009) ve oksidatif DNA hasarına (Muniz vd., 2008) neden olarak genotoksik etki gösterdikleri bilinmektedir. Comet analizi düşük düzeyde DNA hasarını belirleme avantajı nedeniyle tercih edilmekte ve akuatik canlılarda ksenobiyotiklerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gedic vd., 1992; Frenzilli vd., 2009).

*Tilapia mossambica* Peters 1852 farklı subletal monocrotophos derişimlerinin etkisinde bırakılarak comet analizi ile DNA iplik kırıkları belirlenmiştir. Pestisit 96 saat LC<sub>50</sub> değeri (12.5 mg/L) kullanılarak belirlenen 0.313, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5, 3.125, 3.75 ve 4.375 mg/L derişimler 24, 48, 72 ve 96 saat süresince uygulanmıştır. Ortalama comet kuyruk uzunluğunun doza bağı olarak arttığı belirlenmiştir. En fazla artışın 24 saat sonunda meydana geldiği, 96 saat sonunda hasarlı DNA'nın tamiri ve/veya ağır hasarlı hücrelerin kaybı nedeniyle değerlerin kontrol düzeyine geldiği bildirilmiştir (Banu vd., 2001).

Ateeq vd., (2005) yaygın olarak kullanılan iki pestisit 2.4-D ve butachlor'un 48, 72 ve 96 saat uygulama sonrası *C. batrachus* eritrositlerinde genotoksik potansiyelini araştırmışlardır. Test derişimleri pestisitlerin LC<sub>50</sub> değerlerine dayanılarak 2.4-D için 25, 50 ve 75 mg/L ve butachlor için 1, 2 ve 2.5 mg/L olarak belirlenmiştir. Deneme 48, 72 ve 96 saat sürdürülmüştür. Hücrelerde DNA hasarı anoda göç eden genetik materyalin boyutuna göre kuyruk uzunluğundan hesaplanmıştır. Her iki pestisit için de yüksek derişimlerde DNA'nın daha hızlı göç ettiği belirlenmiştir. 2.4-D ve butachlor'un DNA hasarı oluşturma potansiyellerinin eşit olduğu ve comet kuyruk uzunluğunun derişim ve süreye bağılı olarak arttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar analiz yönteminin genotoksik kimyasal maruziyetinin kanıtlanmasında ve DNA hasarı ile onarımının araştırılmasında duyarlı bir izleme aracı olduğunu belirtmişlerdir.

Pandey vd. (2006) akut endosulfan uygulamasının *C. punctatus* solungaç ve böbrek dokularında genotoksik etkisini araştırmışlardır. DNA hasarında her iki dokuda da doza bağılı yanıtlar gözlenmiştir. Bulgular karşılaştırıldığında solungaç dokusunun böbrek dokusuna nazaran pestisit uygulamasına daha duyarlı olduğu bildirilmiştir. Solungaç dokusunun suda çözünmüş kimyasal ile sürekli temas halinde olması nedeniyle hedef organ olduğu belirtilirken, pestisit hangi mekanizma ile DNA'da iplik kırığına yol açtığı ve bunun olası sonuçlarının araştırılması gerektiğini bildirmişlerdir.

*Mystus vittatus* Bloch, 1794'te comet analizi kullanılarak uzun süreli endosulfan uygulamasının genotoksik etkilerini araştırılmıştır. Uygulama derişimleri pestisit LC<sub>50</sub> değerinin 1/4, 1/8 ve 1/10'una karşılık gelen değerler olan 0.5, 0.25 ve 0.21 µg/L olarak belirlenmiştir. Uygulamanın 1, 7, 15, 22, 29, 36 ve 43. günlerinde analiz edilmek üzere solungaç, böbrek dokuları ile kan örneği alınmıştır. Uygulama süresinin DNA hasarı üzerinde önemli etkisinin olduğu, en yüksek hasarın uygulamanın 1. günü gözleendiği ve sonraki günlerde lineer olmayan dereceli bir azalmanın olduğu saptanmıştır. Hasarın doza bağılı olarak arttığı, böbrek dokusunun solungaç ve kana göre DNA hasarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. En yüksek DNA hasarı böbrek, solungaç ve eritrosit için sırasıyla %31.99, %30.56 ve %29.09 olarak verilmiştir (Sharma vd., 2007).

Ventura vd. (2008) atrazinin *O. niloticus*'ta mutajenik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Test derişimleri olarak belirlenen 6.25, 12.5 ve 25 µg/L 72 saat süresince uygulanmış ve kan örnekleri mikronükleus, nükleer anormallik ve comet analizi için kullanılmıştır. Mikronükleus ve nükleer anormallik frekansının kontrole göre

yüksek olduğu saptanmıştır. Comet analizinde kontrol ile karşılaştırıldığında uygulanan tüm derişimlerde DNA hasarında artış olduğu belirlenmiştir.

Comet analizi, mikronükleus testi ve eritrosit çekirdek anormalliklerinin oluşumu kullanılarak akut roundup uygulamasının *P. lineatus*'da genotoksik etkileri araştırılmıştır. Kısa süreli (6, 24 ve 96 saat) statik toksisite testi uygulanmış ve 10 mg/L olarak seçilen derişim intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Solungaç ve eritrosit hücrelerinde hücre canlılığı test edilmiş ve değerin tüm örneklerde %90'ın üzerinde olduğu saptanmıştır. Hasarlı hücre ve comet sayısının eritrositlerde tüm uygulama sürelerinde, solungaç hücrelerinde ise sadece 6 saat uygulama sonrasında kontrole göre önemli oranda arttığı belirlenmiştir. Mikronükleus frekansında 24 ve 96 saat uygulama sonrası artış belirlenirken, diğer çekirdek anormalliklerinde belirgin bir değişim olmadığı bildirilmiştir. Eritrositlerin solungaç hücrelerine göre roundup uygulamasının neden olduğu DNA hasarına daha duyarlı olduğu ve bunun olasılıkla pestisit'in intraperitoneal uygulanmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Eritrosit çekirdek anormalliği frekansının genotoksisite için duyarlı bir biyomarkır olmayabileceği belirtilmiştir (Cavalcante vd., 2008).

Organofosforlu pestisit monocrotophos'un *C. punctatus*'ta solungaç, böbrek ve lenfositlerde genotoksik etkileri araştırılmıştır. Pestisit'in LC<sub>50</sub> değerinin 1/4, 1/8 ve 1/12'si olan 4.78 mg/L, 2.39 mg/L ve 1.59 mg/L uygulama derişimleri olarak seçilmiştir. Yarı statik test sisteminde, uygulama 21 gün sürdürülmüş 1, 4, 7, 14 ve 21. günlerde doku ve kan örnekleri alınmıştır. Comet analizi sonuçları pestisit'in doz ve süreye bağlı olarak çalışılan tüm hücre türlerinde önemli düzeyde DNA hasarına neden olduğunu ve solungaç hücrelerinin böbrek hücreleri ve lenfositlere göre toksisiteye daha duyarlı olduğunu göstermiştir (Ali ve Kumar, 2008).

Chlorpyrifos'un uzun süreli genotoksik etkilerini belirlemek üzere, test organizması *C. punctatus*'u 35 gün süre ile 203.0 µg/L, 102.0 µg/L ve 68.0 µg/L pestisit etkisinde bırakmışlardır. DNA hasarı lenfositlerde ve solungaç hücrelerinde comet kuyruğundaki DNA yüzdesi olarak belirlenmiş ve eritrositlerden mikronükleus sayılmıştır. DNA hasarının her iki hücre tipinde de derişime bağlı olarak arttığı ve solungaç hücrelerinde belirlenen hasarın lenfositlere göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Tüm gruplarda en yüksek DNA hasarı uygulamanın 5. gününde belirlenmiş, uygulama ilerledikçe dereceli olarak lineer olmayan bir azalma görülmüştür. Mikronükleus frekansında %1.53-1.62

arasında süreye bağılı bir indüksiyon belirlenmiştir (Ali vd., 2009).

Simoniello vd. (2009) cypermethrin'in genotoksik etkisini araştırmak üzere 0.300, 0.150 ve 0.075 µg/L derişimlerin etkisinde 96 saat bırakılan *P. lineatus* eritrositlerinde DNA hasarını analiz etmişlerdir. Comet analizinden önce hücre canlılığı Trypan blue boyama yöntemiyle belirlenmiş ve tüm örnekler için oranın %90-95 arasında olduğu belirlenmiştir. Pestisit uygulamasının istatistiksel olarak önemli düzeyde DNA iplik kırığına neden olduğunu bildirmişlerdir.

*C. punctatus*'ta comet analizi ve mikronükleus testi kullanılarak karbamatlı pestisit carbofuran'ın mutajenik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Yarı statik deneme ile pestisit 96 saat LC<sub>50</sub> değeri 0.268 mg/L olarak belirlenmiş ve bu değerin 1/4, 1/2 ve 3/4'üne karşılık gelen 67 µg/L, 134 µg/L ve 201 µg/L derişimler 96 saat süre ile uygulanmıştır. DNA hasarı eritrositlerde ve solungaç hücrelerinde kuyruktaki DNA yüzdesi olarak ölçülmüş ve pestisit her iki hücrede DNA hasarını doz ve süreye bağılı olarak arttırdığı saptanmıştır. Hücrelerde en düşük DNA hasarı 24 saat uygulama sonrası gözlenmiş ve sonrasında lineer olmayan bir artış belirlenmiştir. Solungaç hücrelerinin eritrositlere göre daha duyarlı olduğu belirtilirken, belirlenen en yüksek DNA hasarı 96 saat uygulama sonrası solungaç ve eritrositlerde sırasıyla %22.17 ve %19.22 olarak verilmiştir. Mikronükleus frekansının da periferal kanda doz ve süreye bağılı olarak arttığı bildirilmiştir. Dokuya özgü yanıtların kirleticilerin biyotransformasyonu ve farklı iplik kırıklarının tamiri ile ilgili olarak hücrelerin fizyolojik faaliyetlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Nwani vd., 2010).

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Test Organizması

Araştırma materyali olarak kullanılan ergin erkek gökkuşacağı alabalığı, *O. mykiss* (65.61±10.01 g ve 18.61±0.97 cm) Fırat Alabalık (Birecik – Şanlıurfa) yetiştirme havuzlarından alınarak bir ay süresince laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Adaptasyon periyodunda, balıklar merkezi sistem ile havalandırılmış musluk suyu içeren 150 L akvaryumlarda tutulmuş ve her gün ağırlıklarının %2'si kadar ticari alabalık yemi ile beslenmişlerdir.

##### 3.1.3. Su

Denemeler süresince suyun özellikleri: sıcaklık 15.2±1.0, pH 8.08±0.25, alkalinite 216.43±8.41 mg/L CaCO<sub>3</sub>, sertlik 218.50±16.9 mg/L CaCO<sub>3</sub> ve çözülmüş oksijen 7.3±0.4 mg/L. Sıcaklık ve pH her gün kontrol edilmiş ve 12:12 fotoperiyot uygulanmıştır.

##### 3.1.2. Test Bileşiği

Pestisit olarak dimethoate [(O,O-dimethyl S-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] phosphorodithioate), 400 g/L, Poligor ®] uygulanmıştır.

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Deney Dizayını

Dimethoate'nin *O. mykiss* için 96 saat LC<sub>50</sub> değeri olan, 7.35 mg/L, (Johnson ve Finley, 1980) uygulama derişimlerinin belirlenmesinde referans olarak kullanılmıştır. Subletal derişimler olarak LC<sub>50</sub> değerinin %1, %5 ve %10 olan değerler sırasıyla 0.0735 mg/L, 0.3675 mg/L ve 0.7350 mg/L seçilmiştir. Stok çözeltiler insektisit test suyunda çözülmesiyle hazırlanmış ve akvaryumlarda belirlenen derişimleri elde etmek üzere



seyreltilmiştir. Ergin erkek balıklar adaptasyon periyodundan sonra dimethoate'nin belirlenen derişimlerine 5, 15 ve 30 gün süreyle maruz bırakılmışlardır. Denemeler yarı statik şartlarda yürütölmüş ve buharlaşma ve absorbsiyon gibi nedenlerle pestisit derişiminde meydana gelebilecek değişimleri engellemek amacıyla akvaryum suyunun 2/3'ü 24 saat aralıklarla değiştirilmiştir (A.P.H.A, A.W.W.A, W.P.C.F. 1980). Denemeler sırasında balıkların davranışları düzenli olarak izlenmiştir ve ölüm gözlenmemiştir.

Deneme süreleri sonunda her akvaryumdan 4 balık disekte edilerek beyin ve karaciğer dokuları, kuyruğun kesilmesi yoluyla kan örnekleri jelli (Insepack ®, ST750CG) ve EDTA'lı (Insepack ®, ST520EK3) tüplere alınmıştır. Dokular soğuk fizyolojik tuz çözeltisi (%0.59 NaCl) ile yıkandıktan sonra sıvı azot ile dondurulmuş ve analizlere kadar -80 °C'de saklanmışlardır.

Analizler için beyin ve karaciğer dokuları 1/5 (w/v) olacak şekilde 0.25 M pH 7.4 sükroz tamponda sıvı azot ile homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar +4 °C'de 10000 rpm'de (Hettich Universal 320R) 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant SOD, GPx, CAT, AChE enzim aktiviteleri ile MDA ve protein düzeylerinin spektrofotometrik (Cintra 2002) yöntemlerle belirlenmesinde kullanılmıştır.

Serum steroid hormonlar, glukoz ve toplam protein miktarları ile transaminaz ve alkalen fosfataz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla jelli tüplere alınan kan örnekleri, 5000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek (Hettich Zentrifugen ROTINA 380) serum örnekleri elde edilmiştir. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri hematolojik profilin (RBC, WBC, PLT, Hb, HCT, MCV, MCH, MCHC) belirlenmesi için kullanılmıştır.

Karaciğer ve gonad ağırlıkları kaydedilerek aşağıda belirtilen formöl ile hepato- ve gonadosomatik indekslerin hesaplanmasında kullanılmıştır:

Organosomatik indeks = (Doku ağırlığı/Vücut ağırlığı) x 100

### **3.2.2. Analiz Yöntemleri**

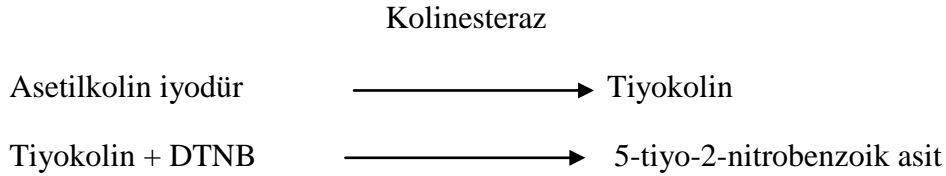
#### **3.2.2.1. Biyokimyasal Kan Parametreleri ve Hematolojik İndeksler**

RBC, WBC, PLT, Hb, HCT, MCV, MCH ve MCHC analizleri Coulter elektriksel empedans prensibini kullanan Beckman Coulter Gen-Ssystem2 Hematology Analyzer ile yapılmıştır (Grimaldi and Scopacasa 1998). Serum testosterone, 17β-estradiol

ve kortizol derişimleri otomatik immün assay analizör kullanılarak (E170, Roche, Hitachi, Osaka, Japan) elektrokemilüminesans immün assay yöntemi ile belirlenmiştir. ALT, AST ve ALP aktiviteleri ile serum glukoz ve toplam protein miktarları Synchron LX20 PRO (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA) kullanılarak yakın infrared partikül immün assay (NIPIA) belirleme sistemi ile analiz edilmiştir.

### 3.2.2.2. Asetilkolinesteraz Yöntemi

Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanması reaksiyonunu katalizler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin oranı ile DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Ellman vd., 1961).



AChE enzim aktivitesini belirlemek üzere Tablo 3.1.'de gösterilen işlemler uygulanmıştır.

**Tablo 3.1.** AChE Yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu\text{L}$ )	Örnek ( $\mu\text{L}$ )
0.1 M Fosfat Tamponu (pH 8.0)	2700	2550
Örnek	200	200
0.01 M DTNB	100	100
$8.52 \times 10^{-3}$ M Etopropazin	-	50
Karıştırılmıştır ve 5 dakika $30^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir.		
0.015 M Asetilkolin iyodür	-	100

Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda 0. ve 5. dakikadaki absorbanları ölçülmüştür. Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

$$\text{AChE Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \frac{1}{13.6}$$

$\Delta\text{OD}$  : Zamana göre absorbans değişimi,

$V_t$ : Toplam hacim,

$V_0$ : Örnek hacmi

### 3.2.2.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'nin,  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve moleküler oksijene ( $\text{O}_2$ ) dismutasyonunu hızlandırmaktadır. Ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikalleri 2-[4-iyodofenil]-3[4-nitrofenol]-5-feniltetrazolium klorid ile kırmızı renkli bir kompleks oluşturur. Eğer ortamda SOD enzimi varsa  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 'ni ortamdan uzaklaştırmak için formazon oluşumu inhibe olur. SOD enzim aktivitesinin ölçümü 505 nm'de formazon oluşumunun yüzde (%) inhibisyonu ile ölçülmüştür (McCord ve Fridovich, 1969).

SOD enzim aktivitesini ölçmek üzere Tablo 3.2.'de gösterilen işlemler uygulanmıştır. Substrat 0.05 mM ksantin ve 0.025 mM INT'nin, 50mM pH 10.2 CAPS tamponunda çözülmesi ile hazırlanmıştır.

**Tablo 3.2.** SOD Yöntemi

Çözeltiler	Kör ( $\mu\text{L}$ )	Örnek ( $\mu\text{L}$ )
Örnek	-	25
0.01 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)	25	-
Substrat	850	850
İyice karıştırılmıştır.		
XOD (80 U/L)	125	125

Tekrar karıştırıldıktan 30 saniye sonra 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansı ( $A_1$ ) 0. dakika okunur. 3 dakika sonra son absorbans ( $A_2$ ) değerleri alınmıştır. Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

$$\Delta A/\text{dakika} = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

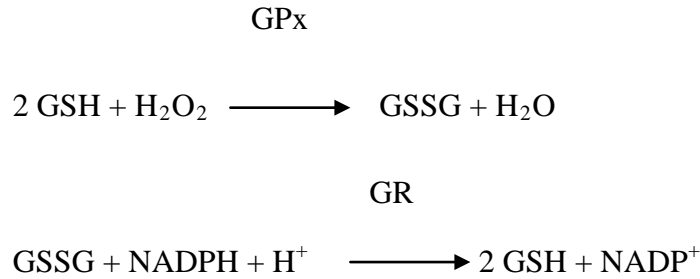
$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dakika} \times 100}{\Delta A/\text{dakika}_{\text{çalışma körü}}}$$

Elde edilen % İnhibisyon değeri standart eğri ile değerlendirilmiştir.

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

#### 3.2.2.4. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

GPx, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından GSH'nin GSSG'ye yükseltgenmesini kataliz eder. Hidrojen peroksit olarak t-butil hidroperoksitin bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'nin NADP<sup>+</sup>'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunması ile ölçülmüştür (Beutler, 1984).



GPx enzim aktivitesini ölçmek üzere Tablo 3.3.'te gösterilen işlemler uygulanmıştır.

**Tablo 3.3.** GPx Yöntemi

Çözeltiler	Örnek (µL)
Saf su	660
0.5 M Tris Tamponu (pH 8.0)	100
0.1 M GSH	25
GR (10 U/mL)	100
2 mM NADPH	100
Örnek	10
37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.	
7 mM t-butil hidroperoksit	10

Kör olarak saf su kullanılmış, oluşan tepkime 37°C'de 1 cm ışık yolu bulunan kuvarz küvetlerde, 340 nm dalga boyunda 0., 2.5. ve 5. dakikalarda absorbans değerleri ölçülerek izlenmiştir. Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

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

$\Delta\text{OD}$  : Zamana göre absorbans değişimi,

t: Zaman,

$V_t$ : Toplam hacim,

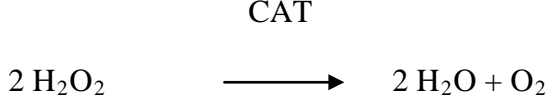
$V_0$ : Örnek hacmi,

6.22: 1 nmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği absorbans değeri.

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

### 3.2.2.5. Katalaz Yöntemi

CAT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yıkımını katalizlemektedir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin katalaz tarafından yıkım hızı, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 230 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektroskopik olarak ölçülmüştür (Beutler, 1984).



CAT enzim aktivitesini belirlemek üzere Tablo 3.4.'te gösterilen işlemler uygulanmıştır.

**Tablo 3.4.** CAT Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
1 M Tris Tamponu (pH 8.0)	50	50
10 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	900
H <sub>2</sub> O	930	30
37 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.		
Örnek	20	20

Kör ve örneğin absorbansı 230 nm dalga boyunda 0., 2.5. ve 5. dakikalarda ölçümler alınmıştır. Hesaplama aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

$$\text{CAT Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_t}{0.071 \times V_ö}$$

$\Delta\text{OD}$ : Zamana göre absorbans değişimi,

$V_t$ : Toplam hacim,

$V_ö$ : Örnek hacmi,

0.071: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin 230 nm dalga boyundaki mM ekstinksiyon katsayısı.

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

### 3.2.2.6. Malondialdehit Yöntemi

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA, aerobik şartlarda, pH 3.5'te Tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C'de 30 dakika inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Ohkawa vd., 1979).

#### Standart Eğri Çizimi

Günlük standart: stok standarttan (1,1',3,3'-tetrametoksiopropan) 6.6 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak 400 nmol/mL'lik günlük standart hazırlanmıştır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanmış ve standart eğri çizimi için Tablo 3.5.'de gösterilen işlemler uygulanmıştır. nBu/Piri (n-bütanol/piridin) çözeltisi 14/1 oranında hazırlanmıştır.

**Tablo 3.5.** MDA Standart Eğrisinin Çizimi

Çözeltiler (mL)	Kör	10 nmol	20 nmol	40 nmol	60 nmol	80 nmol	100 nmol
Standart	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
95 °C'de benmaride 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulmuştur.							
Saf su	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Piri	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

Kuvvetli şekilde vortekslenmiş ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbansı okunmuştur.

MDA miktarını belirlemek üzere Tablo 3.6.'de gösterilen işlemler uygulanmıştır.

**Tablo 3.6.** MDA Yöntemi

Çözeltiler	Kör	Standart	Örnek
Standart (10 nmol/mL)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
%8.1 SDS	0.2	0.2	0.2
%20 HAc	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95 °C’de benmaride 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulmuştur.			
Saf su	1.0	1.0	1.0
nBu/Piri	5.0	5.0	5.0

Kuvvetli şekilde vortekslenmiş ve 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üstteki organik kısım alınarak 532 nm dalga boyunda verdiği absorbanlar kaydedilmiş ve sonuçlar standart eğriden değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.7. Protein Yöntemi

Proteinlerin birçoğu tirozin, triptofan veya her iki aminoasiti de içerirler. Bu aminoasitler serbest ya da katlanmamış bir polipeptid zincirinde mavi renk oluşturmak üzere fosfotungustik asit- molibdik asit ayırıcını (Folin-Ciocalteu) indirgerler. Bu yöntemde proteinler ilk olarak bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluşturmak üzere alkali çözeltide  $\text{Cu}^{+2}$  ile reaksiyona girerler. Ortama Folin-Ciocalteu ayıracı eklendiğinde, indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan rezidüleri birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbanı 750 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Lowry vd., 1951).

### Standart Eğri Çizimi

Yumurta albumini kullanılarak 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişimde stok protein çözeltisi hazırlanmıştır. Çalışma için bu çözeltiden 100, 200, 300, 400 ve 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  derişimlerde standartlar hazırlanmıştır. Standart eğri çizimi için Tablo 3.7.’de gösterilen işlemler uygulanmıştır. Alkali çözelti için, %1  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve %2 Na-K tartarat çözeltilerinin karışımının 1 mL’si ile 50 mL alkali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi karıştırılmıştır. Folin-Ciocalteu



1/2.5 oranında saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

**Tablo 3.7.** Protein Standart Eğrisinin Çizimi

Çözeltiler (mL)	Kör	100 (µg/mL)	200 (µg/mL)	300 (µg/mL)	400 (µg/mL)	500 (µg/mL)
Standart	-	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Saf su	0.3	-	-	-	-	-
Alkali Çözelti	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
15 dakika oda ısısında bekletilmiştir.						
Folin-Ciocalteu	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbanslar kaydedilmiştir. Elde edilen değerler standart eğri çiziminde kullanılmıştır.

Protein miktarını belirlemek üzere Tablo 3.8.'de gösterilen işlemler uygulanmıştır.

**Tablo 3.8.** Protein Yöntemi

Çözeltiler (mL)	Kör	Standart	Örnek
Saf su	0.3	-	-
Standart (50 µg/mL)	-	0.3	-
Örnek	-	-	0.3
Alkali Çözelti	3.0	3.0	3.0
15 dakika oda ısısında bekletilmiştir.			
Folin-Ciocalteu	0.3	0.3	0.3

30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen değerler standart eğriden değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.8. Comet Analizi

*O. mykiss* kan örnekleri, kuyruğun kesilmesi ile heparinli tüplere alınmış ve pıhtılaşmayı önlemek üzere tüpler düzenli olarak alt üst edilmiştir. Hücre canlılığı trypan mavisi (%5 Trypan blue) boya kabul etmeme (exclusion) tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Her bir kan örneğinden 25µL alınarak, içinde 2.5 mL steril hücre kültürü medyumunu (RPMI

1440) bulunan tüplere alınmıştır. Tüplere pestisitler uygulanmadan önce alınan kontrol örneklerinden DNA hasar analizi için kan alındıktan sonra, tüplere pestisit 0.0735 mg/L, 0.3675 mg/L ve 0.7350 mg/L derişimleri her derişim için 3 tekrarlı olmak üzere *in vitro* olarak uygulanmış ve benmaride 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 1. ve 2. saatlerinde, alınan örneklerde DNA hasarı analiz edilmiştir.

Eritrositlerde DNA hasarı, Kocyigit vd. (2005) göre alkali comet yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Bunun için, hücre kültüründen 6 µL örnek 37 °C’de distile su içerisinde hazırlanmış %0.7 düşük erime noktalı agarozun 100 µL’si ile karıştırılmıştır. Bu karışımdan 80 µL alınarak, önceden %1 normal erime noktalı agaroz (60 °C) ile ince bir tabaka halinde kaplanmış olan lam üzerine konarak derhal lamel ile kapatılmıştır. 4 °C’de 5 dk. lamaların katılması bekledikten sonra, lameller kaldırılmış ve lamalar en az 1 saat süre ile taze hazırlanmış soğuk (4°C) lysing çözeltisinde bekletilmiştir (2.5M NaCl, 100mM EDTA-2Na; 10mM Tris-HCl, pH 10-10.5; %1 Triton X-100 ve %10 DMSO kullanımdan hemen önce eklenmiştir). Daha sonra, tek iplikli DNA elde etmek üzere, lamalar taze hazırlanmış alkali elektroforez tamponuna konmuş (4 °C) (0.3 mol/L NaOH ve 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, pH > 13) ve 25 dakika bekledikten sonra elektroforez uygulanmıştır (25V/300mA, 25dk.). Elektroforezden sonra, slaytlar 5 dk. nötrale edilmek üzere yıkanmıştır (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5). DNA hasarını engellemek için aşamalar sırasında doğrudan ışık kullanılmasından sakınılmıştır. Elektroforez sonrası, slaytlar etidyum bromid ile boyanarak (2 µg /mL) lamelle kapatılmış ve x20 büyütme, 546-580 nm’de Olympus (CKX41) marka floresan mikroskobu kullanılarak analiz edilmiştir.

DNA hasarının boyutu görsel sınıflandırma yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Her örnekten, rasgele seçilmiş 100 hücrenin görüntüsü görsel olarak analiz edilmiştir. Her görüntü comet kuyruğunda floresan yoğunluğuna göre sınıflandırılarak 0, 1, 2, 3 veya 4 olarak değer verilmiş (hasarsız hücre 0 ve en yüksek düzeyde hasar 4 olmak üzere) ve slaytın toplam skorunun 0-400 arbitrary units (AU) arasında olması sağlanmıştır. %T-DNA, % H-DNA, TL, LC, TM ve OTM parametreleri görüntü analiz sistemi (CASP Analyzing programme) kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.2.3. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizler SPSS 16.0 bilgisayar programı (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık OneWay-ANOVA LSD çoklu

karşılaştırma testi kullanılarak  $p<0.05$  ve  $p<0.01$  önem düzeylerinde belirlenmiştir. Uygulama derişimleri ve süreler ile analiz edilen parametreler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar ortalama  $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

#### 4.1. Davranışa Etkisi

Kontrol grubunun davranışlarında denemeler süresince bir değişim gözlenmemiştir. Dimethoate'nin subletal derişimleri etkisinde bırakılan gruplarda ise uygulama derişimine ve süreye bağılı olarak davranış anomalileri kaydedilmiştir. En düşük derişim etkisindeki balıklarda akvaryum tabanında gruplaşma ve kararma dışında kontrole benzer davranışlar gözlenmiştir.

Gözlenen en belirgin değişimlerden biri 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlere maruz bırakılan gruplarda yeme olan ilginin uygulamanın 10. günü azalmaya başlamasıdır. En yüksek derişim uygulanan grup tüm tepkileri en yüksek düzeyde göstermiş ve denemelerin son haftası yem yememiştir. Kontrole göre gözlenen davranış farklılıkları hareketsizlik, denge kaybı, akvaryum tabanında gruplaşma, aniden harekete geçme, spiral yüzme hareketleri ve S şeklinde kasılmadır. Fiziksel olarak incelendiğinde pestisit etkisinde balıklarda vücut yüzeyinde renk koyulaşması, kuyruk ve yüzgeçlerde aşınma ve aşırı mukus salgısı gözlenmiştir.

#### 4.2. Hematolojik İndeksler ve Biyokimyasal Kan Parametreleri

##### 4.2.1. Toplam Eritrosit Sayısına (RBC) Etkisi

Dimethoate etkisinde 5 gün süre ile bırakılan *O. mykiss*'de toplam eritrosit sayısında önemli bir değişim bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Uygulamanın 15. gününde sadece en yüksek derişimde ve 30. gününde uygulanan tüm derişimlerde toplam eritrosit sayısının kontrole göre önemli oranda azaldığı belirlenmiştir ( $p<0.01$ , Tablo 4.1.). Korelasyon analizi RBC değişiminin doz veya süre ile ilişkisinin olmadığını göstermiştir ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.1.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te toplam eritrosit sayısına ( $10^6/\mu\text{L}$ ) etkisi.

Derişim (mg/L)	Toplam eritrosit sayısı ( $10^6/\mu\text{L}$ )		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.738±0.09ax	0.735±0.02ax	0.770±0.06ax
0.0735	0.743±0.05ax	0.635±0.06ax	0.388±0.04by*
0.3675	0.738±0.09ax	0.588±0.06abx	0.388±0.03by*
0.7350	0.788±0.13ax	0.435±0.06by*	0.428±0.03by*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.2. Toplam Lökosit Sayısına (WBC) Etkisi

Pestisit etkisinde, uygulamanın 5. günü toplam lökosit sayısının kontrol düzeyinde olduğu bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Uygulamanın 15. gününde 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde kontrole göre önemli azalma ( $p<0.01$ ) belirlenmiştir. Otuz gün uygulamadan sonra ise tüm test derişimlerinin lökosit sayısının azaldığı bulunmuştur ( $p<0.01$ , Tablo 4.2.). Korelasyon analizi WBC değişimi ile 15 ve 30 gün uygulama süreleri arasında pozitif ve önemli bir ilişki olduğunu göstermektedir ( $r=0.598$   $p<0.05$ ). Belirlenen azalmanın derişim ile ilişkili olduğu ve en yüksek korelasyon katsayısının  $r=0.824$  olarak 0.0735 ve 0.3675 mg/L derişimler arasında olduğu hesaplanmıştır ( $p<0.01$ ).

**Tablo 4.2.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te toplam lökosit sayısına ( $10^3/\mu\text{L}$ ) etkisi

Derişim (mg/L)	Toplam Lökosit Sayısı ( $10^3/\mu\text{L}$ )		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	202.83±1.42ax	198.35±1.37ax	197.75±1.46ax
0.0735	203.85±0.91ax	197.53±0.74ax	175.83±4.26by*
0.3675	203.45±0.47ax	189.20±3.91by*	179.78±2.56bz*
0.7350	203.63±2.26ax	178.98±2.87cy*	169.15±1.22cz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.3. Trombosit (PLT) Miktarına Etkisi

Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te trombosit sayısı sadece 5 günlük uygulama sonrası 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde istatistiksel olarak önemli oranda azalmıştır ( $p<0.05$ ). Diğer uygulama sürelerinde belirgin bir değişim saptanmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.3.).

**Tablo 4.3.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te toplam trombosit miktarına ( $10^3/\mu\text{L}$ ) etkisi

Derişim (mg/L)	Trombosit ( $10^3/\mu\text{L}$ )		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	9.75±1.25ax	9.50±1.56ax	9.50±0.29ax
0.0735	9.25±0.85abx	7.00±1.08ax	9.00±0.91ax
0.3675	6.75±0.48bcx	8.50±1.04ax	7.25±1.03ax
0.7350	6.50±0.29cx	7.25±1.03ax	7.30±0.70ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.4. Hemoglobin (Hb) Miktarına Etkisi

Pestisit uygulaması 5 gün uygulama sonrası hemoglobin miktarını değiştirmemiştir ( $p>0.05$ ). Uygulamanın 15. gününde sadece en yüksek derişimde hemoglobin miktarında azalma belirlenirken ( $p<0.05$ ), 30 gün süre ile pestisit etkisinde kalan gruplarda hemoglobin miktarının tüm uygulama derişimlerinde kontrole göre azaldığı saptanmıştır ( $p<0.01$ , Tablo 4.4). Hemoglobin miktarındaki değişim ile uygulama süreleri arasında bir ilişki olmadığı, test derişimleri incelendiğinde 0.0735 ve 0.7350 mg/L derişimler arasında pozitif ve önemli bir korelasyon katsayısına sahip olduğu bulunmuştur ( $r=0.588$ ,  $p<0.05$ ).

**Tablo 4.4.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te hemoglobin miktarına (g/dL) etkisi

Derişim (mg/L)	Hemoglobin (g/dL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	6.90±0.65ax	5.88±0.09ax	6.73±0.52ax
0.0735	6.80±0.44ax	5.18±0.49abxy	3.45±0.66by*
0.3675	6.65±0.95ax	4.65±0.58aby	3.55±0.30by*
0.7350	7.08±1.08ax	4.00±0.75by	3.98±0.48by*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.5. Hematokrit (HCT) Miktarına Etkisi

Dimethoate uygulamasının 5 ve 15. günlerinde hematokrit miktarında önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.5.). Hematokrit miktarında, uygulamanın 30. günü 0.3675 mg/L derişimde  $p<0.05$ , 0.0735 ve 0.7350 mg/L derişimlerinde ise  $p<0.01$  önemlilik düzeyinde azalma belirlenmiştir. Bu azalmanın deneme süreleri veya derişimleri ile ilişkili olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.5.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te hematokrit miktarına (%) etkisi

Derişim (mg/L)	Hematokrit(%)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	18.63±2.34ax	17.20±1.01ax	19.60±2.05ax
0.0735	18.48±1.52ax	14.85±1.39axy	11.53±2.21by*
0.3675	18.80±2.23ax	13.55±1.58ax	12.98±3.77bx
0.7350	19.38±2.75ax	12.03±2.38ay	11.53±1.60by*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.6. Ortalama Eritrosit Hacmine (MCV) Etkisi

MCV değerinde, uygulamanın 5. gününde önemli bir değişim saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Dimethoate etkisinde 15 ve 30 gün süre ile bırakılan gruplarda ise tüm test derişimlerinin MCV değerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ( $p<0.01$ , Tablo 4.6). MCV değerindeki bu azalmanın uygulama süreleri ve pestisit derişimleri ile pozitif ilişkili olduğu saptanmıştır ( $r=0.980$  ve  $r=0.901$ ,  $p<0.01$ ).

**Tablo 4.6.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te MCV'ye (fL) etkisi

Derişim (mg/L)	MCV (fL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	247.60±2.08abx	253.85±2.39ax	254.20±1.12ax
0.0735	244.18±5.01abx	233.13±3.34by*	226.88±2.73by*
0.3675	252.13±1.51ax	217.50±1.42cy*	214.73±2.32cy*
0.7350	242.68±3.19bx	211.45±4.26cy*	196.5±3.15dz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.7. Ortalama Eritrosit Hemoglobinine (MCH) Etkisi

Pestisit uygulamasının 5. gün MCH üzerinde bir etkisi olmazken ( $p>0.05$ ), uygulamanın 15. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ( $p<0.01$ ). Otuz gün süre ile pestisit etkisine bırakılan gruplarda tüm uygulama derişimlerinde MCH değerinin kontrole göre azaldığı saptanmıştır ( $p<0.01$ , Tablo 4.7). Deneme süreleri ve test derişimleri ile MCH değeri arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulunmuştur ( $p\leq 0.05$ ).

**Tablo 4.7.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te MCH'ye (p/g) etkisi

Derişim (mg/L)	MCH (p/g)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	91.48±0.88ax	87.95±3.51ax	88.05±2.85ax
0.0735	91.63±0.99ax	81.90±1.61aby	75.45±2.38bz*
0.3675	90.05±3.38ax	76.15±0.74by*	74.15±1.88by*
0.7350	89.13±3.18ax	77.85±1.41by*	77.48±1.90by*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.8. Ortalama Eritrosit Hemoglobin Derişimine (MCHC) Etkisi

Dimethoate uygulamasının 30. günü 0.0735 mg/L derişimde belirlenen azalma dışında ( $p<0.05$ ), pestisit uygulaması MCHC'de istatistiksel olarak önemli bir değişime neden olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te MCHC'ye (g/dL) etkisi

Derişim (mg/L)	MCHC (g/dL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	37.53±2.02ax	33.93±0.49ax	34.80±1.59ax
0.0735	36.95±0.97ax	35.00±1.15ax	30.13±0.69by
0.3675	35.18±1.46ax	34.33±2.41ax	31.08±0.65abx
0.7350	37.50±2.18ax	33.53±1.22ax	34.20±1.69abx

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



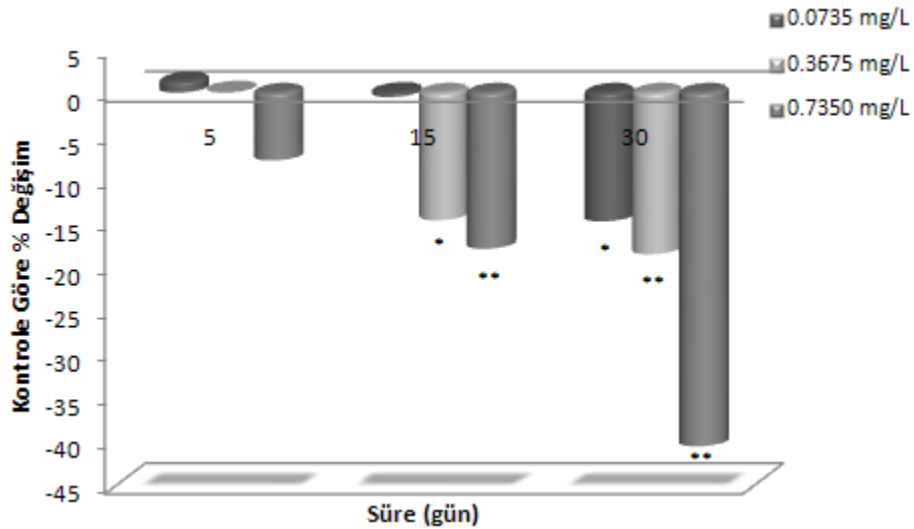
#### 4.2.9. Toplam Protein Miktarına Etkisi

Dimethoate etkisinde 5. gün serum toplam protein miktarında kontrol ile uygulama grupları arasında bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.9). Uygulamanın 15. günü 0.3675 mg/L derişimde %14.65 ve 0.7350 mg/L derişimde %17.93 düzeyinde azalma olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ , Şekil 4.1). Dimethoate etkisinde 30 gün kalan balıklarda, serum toplam protein miktarının tüm derişimlerde azaldığı, en fazla azalmanın 0.7350 mg/L derişimde %40.6 olduğu belirlenmiştir ( $p<0.01$ ). Protein miktarında belirlenen azalmanın süre ile pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur ( $r=0.782$ ,  $p<0.01$ ).

**Tablo 4.9.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te toplam protein miktarına (g/dL) etkisi

Derişim (mg/L)	Toplam Protein (g/dL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	3.85±0.18ax	3.96±0.15ax	3.99±0.24ax
0.0735	3.90±0.31axy	3.94±0.09ax	3.40±0.04by
0.3675	3.85±0.13ax	3.38±0.09bxy	3.25±0.07by*
0.7350	3.55±0.13ax	3.25±0.09bx*	2.37±0.36cy*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.1.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum toplam protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

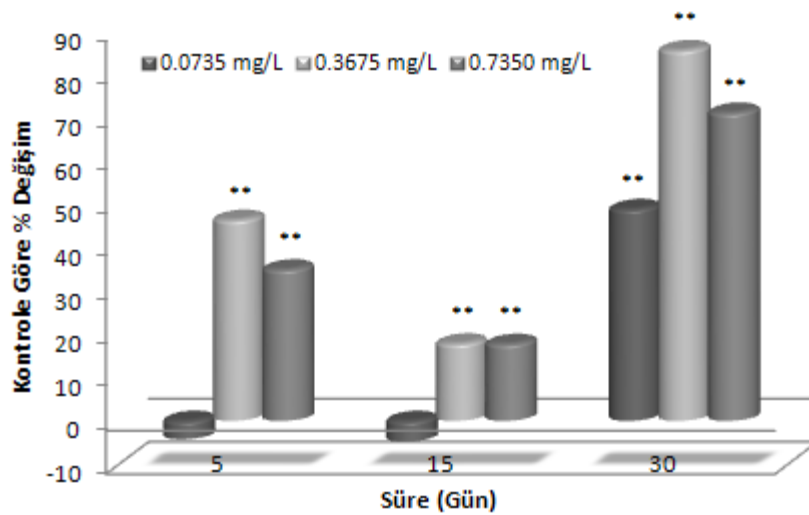
#### 4.2.10. Glukoz Miktarına Etkisi

*O. mykiss*'te dimethoate uygulamasının 5 ve 15. günlerinde glukoz miktarının 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde istatistiksel olarak önemli oranda arttığı saptanmıştır ( $p<0.01$ ). Uygulamanın 30. gününde glukoz miktarındaki artışın devam ettiği ve tüm test derişimlerinde kontrole göre değişimin önemli olduğu bulunmuştur ( $p<0.01$ , Tablo 4.10). Glukoz miktarının kontrole göre yüzde değişimi Şekil 4.2'de verilmektedir. En yüksek artış %85.55 ile uygulamanın 30. günü 0.3675 mg/L derişimde meydana gelmiştir. Glukoz ile pestisit derişimleri ve uygulama süreleri arasında pozitif ilişki belirlenmiştir ( $r=0.828$  ve  $r=0.790$ ,  $p<0.05$ ).

**Tablo 4.10.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te glukoz miktarına (mg/dL) etkisi

Derişim (mg/L)	Glukoz (mg/dL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	41.50±1.19ax	42.00±1.47ax	45.00±2.12ax
0.0735	39.75±1.65ax	40.00±3.24ax	67.00±2.97by*
0.3675	60.75±1.93bx*	49.50±0.96by*	83.50±3.66cz*
0.7350	56.00±1.41bx*	49.50±1.32bx*	77.00±3.94cy*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.2.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum glukoz miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

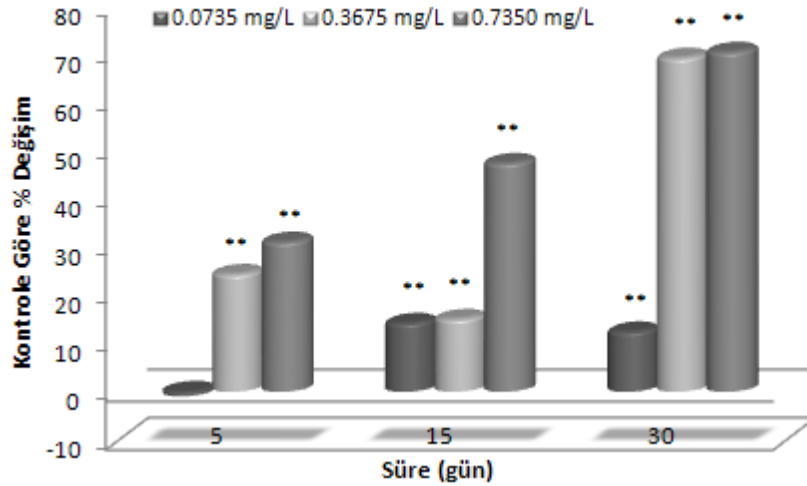
#### 4.2.11. Aspartat Aminotransferaz (AST) Aktivitesine Etkisi

Dimethoate etkisinde *O. mykiss* serum AST aktivitesinin uygulamanın 5. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde kontrole göre sırasıyla %24.41 ve %31.09 artış gösterdiği bulunmuştur ( $p<0.01$ , Tablo 4.11). Uygulamanın 15 ve 30. günlerinde enzim aktivitesindeki artışın devam ettiği ve denenen tüm test derişimlerinin enzim aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir indüksiyona neden olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ , Şekil 4.3). AST aktivitesindeki en fazla artış 30. gün 0.7350 mg/L derişimde %70.47 olarak hesaplanmıştır. Deneme süreleri ile AST aktivitesi arasında pozitif ilişki bulunmuştur ( $r=0.942$ ,  $p<0.01$ ).

**Tablo 4.11.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum AST aktivitesine (IU/L) etkisi

Derişim (mg/L)	AST (IU/L)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	557.25±4.64ax	545.25±23.68ax	511.25±9.52ax
0.0735	552.25±11.07ax	623.00±4.30by*	575.00±20.96bxy*
0.3675	693.25±10.93bx*	627.50±23.73by*	865.25±20.44cz*
0.7350	730.50±9.68bx*	803.75±35.41cy*	871.50±20.61cz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.3.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum AST aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

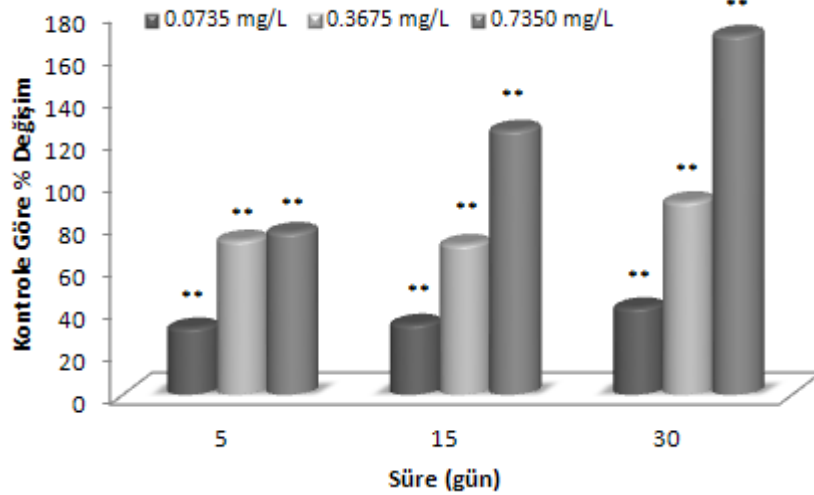
#### 4.2.12. Alanin Aminotransferaz (ALT) Aktivitesine Etkisi

Dimethoate uygulamasının *O. mykiss*'te serum ALT aktivitesini uygulamanın 5. gününden başlayarak uygulanan tüm derişimlerde arttırdığı ve bu indüksiyonun tüm uygulama periyotlarında devam ettiği saptanmıştır ( $p<0.01$ , Tablo 4.12). Enzim aktivitesindeki artışın uygulama süreleri ile pozitif ilişkili olduğu ( $r=0.954$ ,  $p<0.01$ ), yüzde değişimlerin denemelerin 5. gününde %31.53-76.58, 15. gününde %33.33-124.79 ve 30 gününde %41.07-169.64 arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

**Tablo 4.12.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum ALT aktivitesine (IU/L) etkisi

Derişim (mg/L)	ALT (IU/L)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	27.75±0.75ax	29.25±0.63ax	28.00±0.91ax
0.0735	36.50±0.65bx*	39.00±1.08bx*	39.50±2.78bx*
0.3675	48.00±1.08cx*	50.00±1.96cx*	53.50±1.85cx*
0.7350	49.00±0.91cx*	65.75±3.04dy*	75.50±4.27dz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.4.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum ALT aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.2.13. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesine Etkisi

Dimethoate etkisinde *O. mykiss* serum ALP aktivitesinin, denenen derişimler ve

uygulama sürelerinde kontrole göre önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir ( $p>0.05$ , Tablo 4.13).

**Tablo 4.13.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum ALP aktivitesine (IU/L) etkisi

Derişim (mg/L)	ALP (IU/L)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	61.00±7.35ax	55.00±8.23ax	57.75±1.38ax
0.0735	50.00±4.71ax	52.00±7.01ax	61.25±5.19ax
0.3675	56.25±5.50ax	55.25±3.45ax	54.00±4.44ax
0.7350	52.25±2.02ax	55.75±8.11ax	55.75±5.19ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

### 4.3. Steroid Hormonlar

#### 4.3.1. Testosteron Miktarına Etkisi

Dimethoate uygulaması *O. mykiss*'te testosteron miktarında istatistiksel olarak önemli bir değişime neden olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.14). Değerlerin tüm uygulama derişimlerinde ve sürelerinde kontrol düzeyinde olduğu saptanmıştır.

**Tablo 4.14.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum testosteron miktarına (ng/mL) etkisi

Derişim (mg/L)	Testosteron (ng/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.028±0.002ax	0.031±0.005ax	0.026±0.002ax
0.0735	0.027±0.001ax	0.025±0.002ax	0.028±0.003ax
0.3675	0.027±0.001ax	0.027±0.001ax	0.026±0.001ax
0.7350	0.026±0.001ax	0.027±0.001ax	0.025±0.001ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.3.2. 17 $\beta$ -Estradiol Miktarına Etkisi

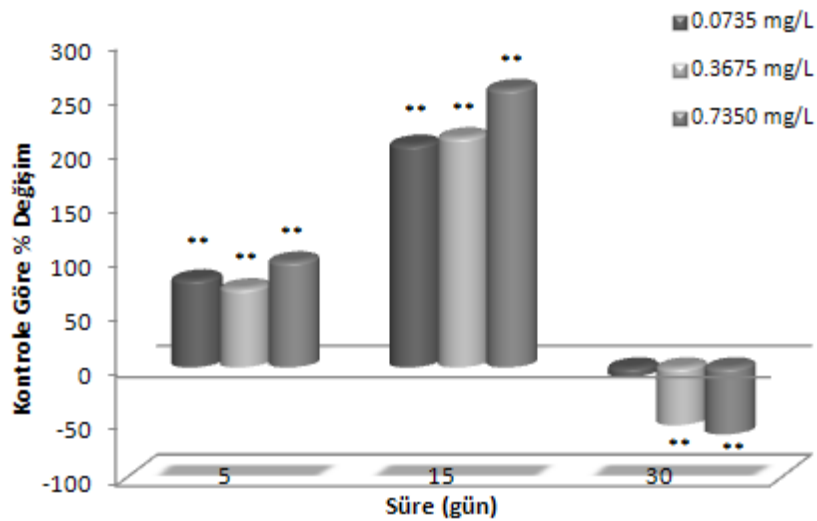
*O. mykiss* serum 17 $\beta$ -estradiol miktarında dimethoate etkisinde önce artan sonra azalan bifazik bir değişim belirlenmiştir. Uygulamanın 5 ve 15. günlerinde estradiol miktarı tüm derişimlerde kontrole göre önemli oranda artmıştır ( $p<0.01$ , Tablo 4.15). Ancak, 30

gün süre ile pestisit etkisinde bırakılan gruplarda 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde istatistiksel olarak önemli bir azalma saptanmıştır ( $p<0.01$ ). Dimethoate etkisinde 17 $\beta$ -estradiol miktarındaki en belirgin artma ve azalma en yüksek pestisit derişiminde 15. ve 30. günlerde sırasıyla %255.62 ve %61.51 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5). Korelasyon analizi, 17 $\beta$ -estradiol miktarı ile test süreleri ve derişimleri arasında pozitif ve önemli bir ilişkinin olduğunu göstermektedir ( $r=0.860$  ve  $r=0.960$ ,  $p<0.01$ ).

**Tablo 4.15.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum 17 $\beta$ -Estradiol miktarına (pg/mL) etkisi

Derişim (mg/L)	17 $\beta$ -Estradiol (pg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	16.30 $\pm$ 0.71ax	14.33 $\pm$ 0.29ax	15.12 $\pm$ 0.67ax
0.0735	29.47 $\pm$ 1.44bx*	43.64 $\pm$ 3.58by*	13.78 $\pm$ 1.10az
0.3675	28.15 $\pm$ 1.10bx*	44.60 $\pm$ 3.87by*	7.09 $\pm$ 1.81bz*
0.7350	32.17 $\pm$ 1.83bx*	50.96 $\pm$ 2.32cy*	5.82 $\pm$ 0.58bz*

Değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.5.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum 17 $\beta$ -Estradiol miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.3.3. Kortizol Miktarına Etkisi

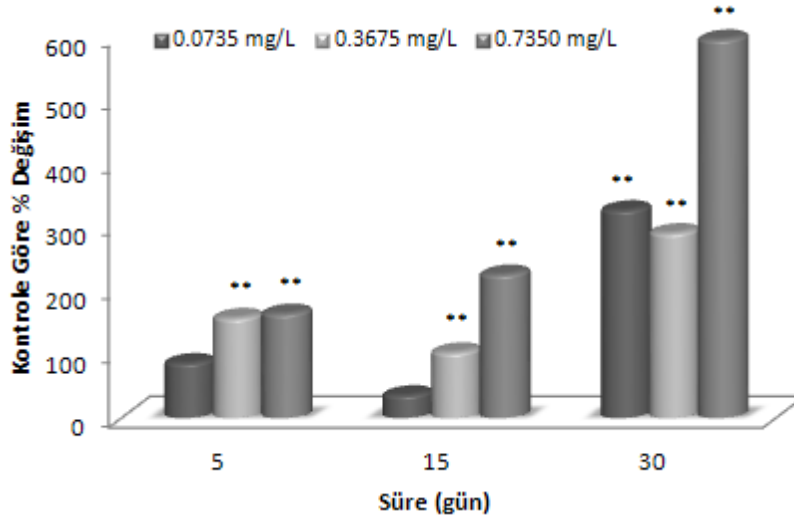
Pestisit uygulamasını takiben 5. ve 15. günlerde, en düşük derişimde kortizol miktarında değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.16). Ancak, pestisit 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimleri etkisinde bırakılan gruplarda kortizol miktarında kontrole göre %157.56–

225.71 artış olduğu belirlenmiştir ( $p<0.01$ , Şekil 4.6). Kortizol miktarındaki artışın 30. günde de devam ettiği, kontrole göre yüzde değişimin 0.0735, 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimler için sırasıyla %326.98, %291.01 ve %595.32 olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ). Kortizol miktarındaki artışın süreler ve pestisit derişimleri ile pozitif ilişkili olduğu bulunmuştur ( $r=0.781$  ve  $r=0.866$ ,  $p<0.01$ ).

**Tablo 4.16.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te serum kortizol düzeyine (ug/dL) etkisi

Derişim (mg/L)	Kortizol (ug/dL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	2.38±0.07ax	3.15±0.30ax	2.78±0.37ax
0.0735	4.44±0.45abx	4.29±0.29ax	11.87±0.67by*
0.3675	6.13±0.68bx*	6.41±0.45bx*	10.87±1.21by*
0.7350	6.29±0,53bx*	10.26±1.23by*	19.33±1.67cz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.6.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te serum kortizol miktarının kontrole kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.4. Organosomatik İndeksler

##### 4.4.1. Hepatosomatik İndekse Etkisi

Hepatosomatik indeksin dimethoate uygulamasının 5. gününde kontrol düzeyinde olduğu bulunmuştur ( $p>0.05$ , Tablo 4.17). Pestisit uygulamasını takiben 15. günün

sadece en yüksek derişiminde, 30. günün ise 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerinde HSI'nin azaldığı saptanmıştır ( $p<0.01$ ). HSI ile uygulama sürelerinin arasında bir ilişki olmadığı, test derişimleri ile pozitif ve önemli bir ilişkinin olduğu korelasyon analizi ile belirlenmiştir ( $r=0.731$ ,  $p<0.05$ ).

**Tablo 4.17.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te hepatosomatik indekse etkisi

Derişim (mg/L)	HSİ		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.9103±0.016ax	0.9502±0.057ax	0.9382±0.042ax
0.0735	0.9335±0.021ax	0.9423±0.021ax	0.8658±0.019abx
0.3675	0.8624±0.047axy	0.9563±0.021ax	0.7711±0.019by*
0.7350	0.8515±0.061ax	0.7871±0.021bx*	0.6409±0.022cy*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.4.2. Gonadosomatik İndekse Etkisi

Dimethoate uygulamasının *O. mykiss*'te GSI'yi etkilemediği, tüm uygulama süreleri ve test derişimlerinde değerin kontrol düzeyinde olduğu belirlenmiştir ( $p>0.05$ , Tablo 4.18).

**Tablo 4.18.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te gonadosomatik indekse etkisi

Derişim (mg/L)	GSI		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	1.1318±0.13ax	1.1123±0.29ax	1.1473±0.08ax
0.0735	1.0271±0.03ax	1.3185±0.21ax	1.1658±0.12ax
0.3675	1.0260±0.07ax	1.3394±0.11ax	1.1398±0.04ax
0.7350	1.0236±0.04ax	1.3914±0.12ax	1.1217±0.09ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.5. AChE Aktivitesine Etkisi

Karaciğer dokusunda dimethoate etkisinde 5. gün AChE spesifik aktivitesinde önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.19). Pestisit uygulamasının 15. günü 0.3675 ile 0.7350 mg/L ve 30. günü tüm uygulanan derişimlerinde enzim aktivitesinde süreye bağlı bir azalma belirlenmiştir ( $r=0.642$ ,  $p<0.01$ ). Enzim aktivitesinde belirlenen en yüksek



inhibisyon oranları 15 ve 30. günler için sırası ile %44.61 ve %70.32'dir (Şekil 4.7).

**Tablo 4.19.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppm)	AChE (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0912±0.01ax	0.0937±0.01ax	0.0886±0.01ax
0.0735	0.0824±0.01ax	0.0734±0.01axy	0.0539±0.01by*
0.3675	0.0716±0.01ax	0.0662±0.01bxy	0.0415±0.01cy*
0.7350	0.0678±0.01ax	0.0519±0.01bx*	0.0263±0.01cy*

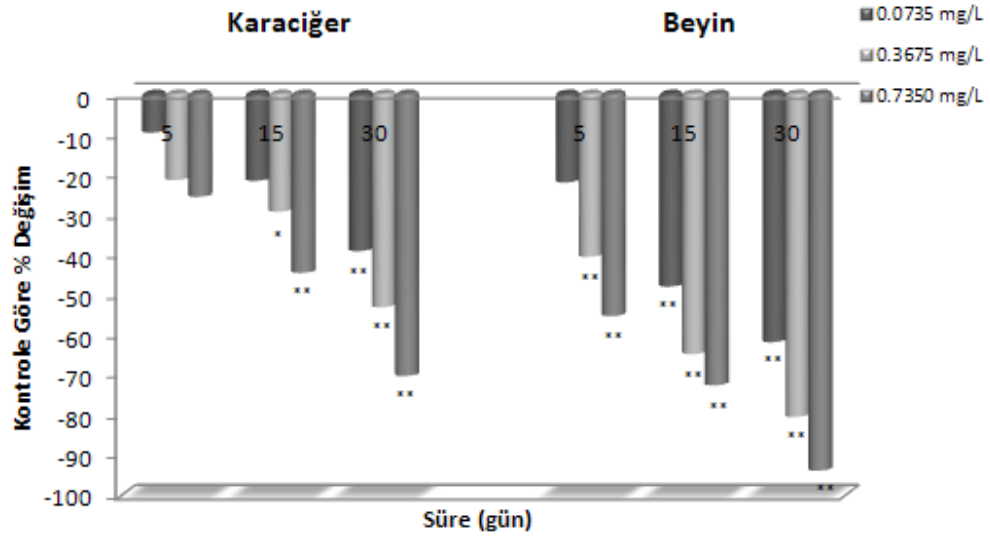
Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, \*p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Beyin dokusunda dimethoate etkisinde uygulamanın 5. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde, 15 ve 30. günlerinde tüm deneme derişimlerinde AChE spesifik aktivitesi doza ve süreye bağlı olarak azalmıştır (r=0.841 ve r=0.959, p<0.01). Enzim aktivitesinde belirlenen en yüksek inhibisyonlar 5., 15. ve 30. günler için sırasıyla %55.39, %72.62 ve %93.91 şeklindedir (Tablo 4.20, Şekil 4.7).

**Tablo 4.20.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda AChE spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	AChE (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.3302±0.05ax	0.3287±0.04ax	0.3511±0.06ax
0.0735	0.2574±0.04abx	0.1709±0.03by*	0.1339±0.02by*
0.3675	0.1961±0.02bcx*	0.1155±0.01by*	0.0683±0.01bcy*
0.7350	0.1473±0.02cx*	0.0900±0.01by*	0.0214±0.01cy*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, \*p<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.7.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında AChE spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.6. Antioksidan Enzimler

##### 4.6.1. SOD Aktivitesine Etkisi

Karaciğer dokusunda SOD spesifik aktivitesi dimethoate uygulamasının 5 ve 15. günlerinde en düşük derişimde değişmezken, 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde doz ve süreye bağlı olarak artış göstermiştir ( $r=0.799$  ve  $r=0.857$ ,  $p < 0.01$ ). En yüksek yüzde artış 5. ve 15. günlerde sırasıyla %179.39 ve %340.36 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.21, Şekil 4.8). Pestisit uygulamasının 30. günü SOD aktivitesi 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde doza bağlı olarak azalmıştır ( $r=0.842$ ,  $p < 0.01$ ). En yüksek inhibisyon oranı, 0.7350 mg/L derişimde %83.73 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 4.21.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda SOD spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	SOD (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0791±0.01ax	0.0840±0.01ax	0.0842±0.01ax
0.0735	0.0769±0.01ax	0.1471±0.01by	0.0545±0.01abx
0.3675	0.1361±0.01bx	0.2390±0.02cy*	0.0239±0.01bz
0.7350	0.2210±0.02cx*	0.3699±0.05dy*	0.0137±0.01bz*

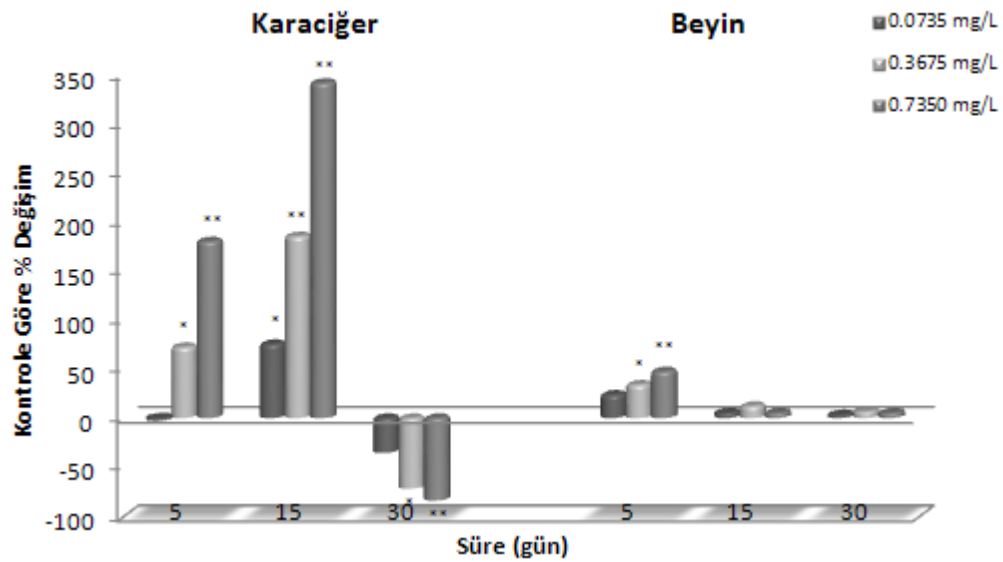
Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$  düzeyinde önemlidir.

Beyin dokusunda SOD aktivitesi sadece dimethoate uygulamasının 5. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde sırasıyla %33.90 ( $p<0.05$ ) ve %47.46 ( $p<0.01$ ) induksiyon göstermiştir (Tablo 4.22, Şekil 4.8). Belirlenen artışın doza bağlı olduğu ( $r=0.622$ ,  $p<0.05$ ), diğer uygulama sürelerinde kontrole göre önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.22.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda SOD spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	SOD (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0059±0.001ax	0.0057±0.001ax	0.0058±0.001ax
0.0735	0.0073±0.001abx	0.0060±0.001ax	0.0060±0.001ax
0.3675	0.0079±0.001bx	0.0064±0.001ax	0.0062±0.001ax
0.7350	0.0087±0.001bx*	0.0060±0.001ax	0.0061±0.001ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.8.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında SOD spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.6.2. GPx Aktivitesine Etkisi

Karaciğer dokusunda uygulamanın 5. günü GPx spesifik aktivitesinde önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.23). Dimethoate uygulamasını takiben 15. günde aktivitenin tüm uygulama derişimlerinde doza bağı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir ( $r=0.970$ ,  $p<0.01$ ). GPx aktivitesindeki indüksiyon oranları 0.0735, 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimler için sırasıyla % 47.71, %94.72 ve %134.82 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9). Denemelerin 30. gününde aktivitenin 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde %33.91 ve %54.5 azaldığı saptanmıştır.

**Tablo 4.23.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	GPx (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.1783±0.01ax	0.1933±0.01ax	0.1899±0.01ax
0.0735	0.1876±0.01ax	0.2778±0.02by*	0.1539±0.02abx
0.3675	0.1817±0.01ax	0.3764±0.04cy*	0.1255±0.01bcz
0.7350	0.1971±0.01ax	0.4539±0.03dy*	0.0864±0.02cz*

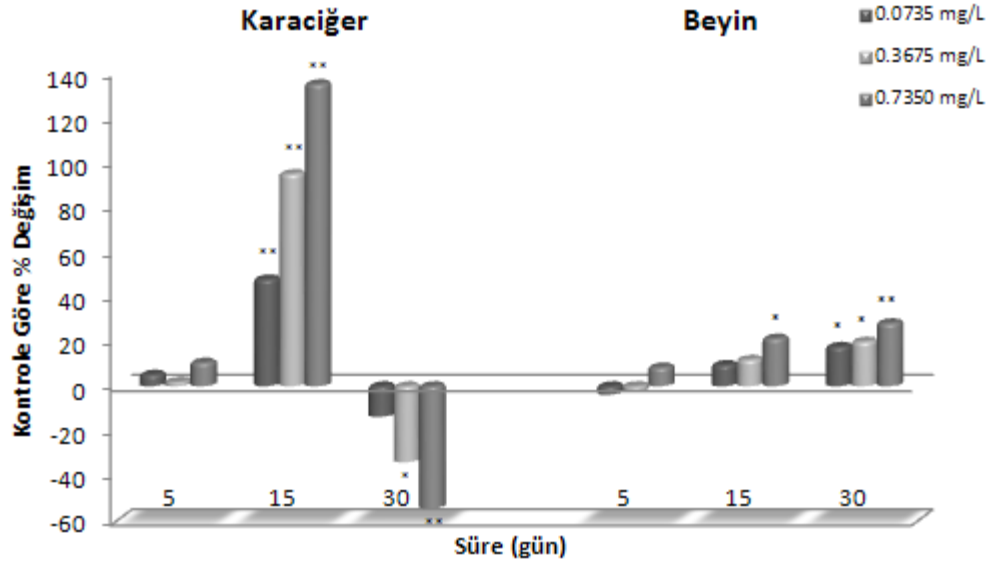
Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

*O. mykiss* beyin dokusunda GPx spesifik aktivitesi uygulamanın 5. günü değişmezken (Tablo 4.24), 15. günün en yüksek derişiminde ve 30. günün tüm uygulama derişimlerinde doza bağı artış gösterdiği belirlenmiştir ( $r= 0.654$ ,  $p<0.05$ ). Enzim aktivitesindeki en yüksek artışların 15. gün %21.32 ve 30. gün %28.13 olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).

**Tablo 4.24.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda GPx spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	GPx (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0630±0.002ax	0.0591±0.005ax	0.0608±0.004ax
0.0735	0.0606±0.004ax	0.0647±0.004abxy	0.0715±0.004by
0.3675	0.0615±0.004ax	0.0661±0.001abxy	0.0729±0.002by
0.7350	0.0683±0.002ax	0.0717±0.004bxy	0.0779±0.006bx*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, \*p<0.01 düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.9.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında GPx spesifik aktivitesinin kontrolle göre yüzde değişimi. \*p<0.05 ve \*\*p<0.01 düzeyinde önemlidir.

#### 4.6.3 CAT Aktivitesine Etkisi

Dimethoate etkisinde, *O. mykiss* karaciğer dokusunda CAT spesifik aktivitesinde denemelerin 5. gününde belirgin bir değişim gözlenmemiştir (p>0.05, Tablo 4.25). Aktivitenin uygulamanın 15. gününde tüm derişimlerde doza bağlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir (r=0.930, p<0.01). Yüzde indüksiyon oranları 0.0735, 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimler için sırasıyla %17.73, %32.66 ve %88.77'dir (Şekil 4.10). Dimethoate uygulamasının 30. günü CAT spesifik aktivitesinin sadece en yüksek derişimde %18.89

oranında inhibe olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

**Tablo 4.25.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda CAT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Doz (mg/L)	CAT (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	72.74±2.54ax	69.20±2.21ax	72.57±2.26ax
0.0735	72.46±2.36axy	81.47±2.97bx*	70.63±1.83ay
0.3675	71.87±2.58ax	91.80±3.15cy*	65.96±1.99abx
0.7350	72.42±2.48ax	130.63±8.07dy*	58.86±2.41bz*

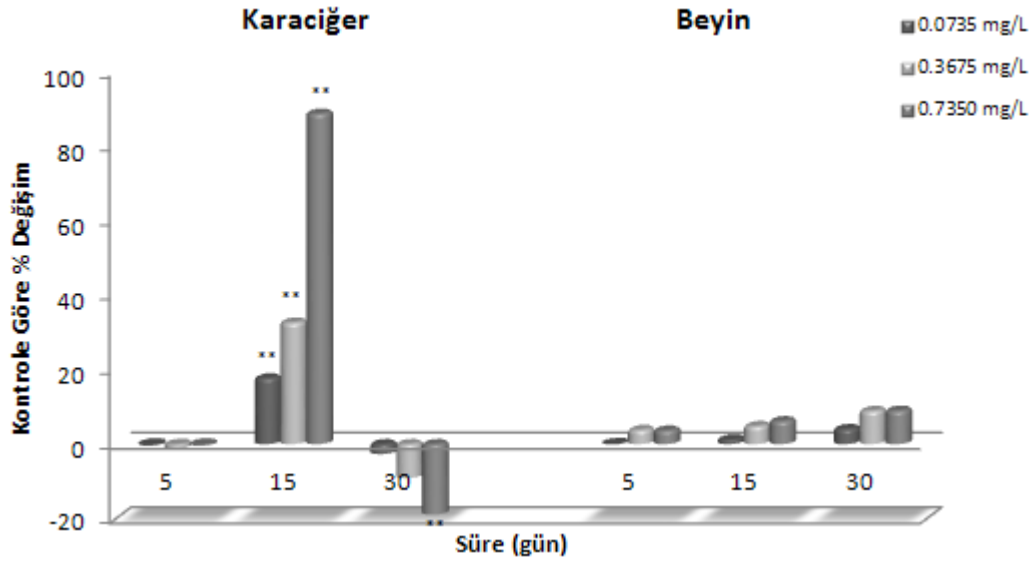
Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

Beyin dokusunda dimethoate uygulaması CAT spesifik aktivitesinde önemli bir değişime neden olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.26). Uygulamaların 15. ve 30. günlerinde enzim aktivitesinde %6 ile %9 arasında artış belirlenmesine rağmen, bu değişim kontrole göre istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Şekil 4.10).

**Tablo 4.26.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda CAT spesifik aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Doz (mg/L)	CAT (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	1.409±0.09ax	1.405±0.05ax	1.445±0.07ax
0.0735	1.408±0.06ax	1.422±0.11ax	1.504±0.08ax
0.3675	1.463±0.04ax	1.473±0.08ax	1.574±0.10ax
0.7350	1.461±0.05ax	1.492±0.06ax	1.575±0.09ax

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.10.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında CAT spesifik aktivitesinin kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.7. MDA Miktarına Etkisi

*O. mykiss* karaciğer dokusunda MDA miktarı, dimethoate uygulamasını takiben 5. ve 15. günlerin 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde, 30. günde denenen tüm derişimlerde kontrole göre önemli ve süre ile pozitif ilişkili bir artış göstermiştir ( $r=0.743$ ,  $p<0.01$ ). Uygulamaların 5., 15. ve 30. günlerinde MDA miktarında kaydedilen en yüksek artışlar sırasıyla %41.34, %48.21 ve %71.92 şeklindedir (Tablo 4.27, Şekil 4.11).

**Tablo 4.27.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	MDA (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	4.91±0.206ax	5.02±0.126ax	4.95±0.106ax
0.0735	5.00±0.155ax	5.62±0.169abxy	6.03±0.372by
0.3675	6.12±0.302bx*	6.16±0.127bx*	6.52±0.489bx*
0.7350	6.94±0.135bx*	7.44±0.565cx*	8.51±0.427cz*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

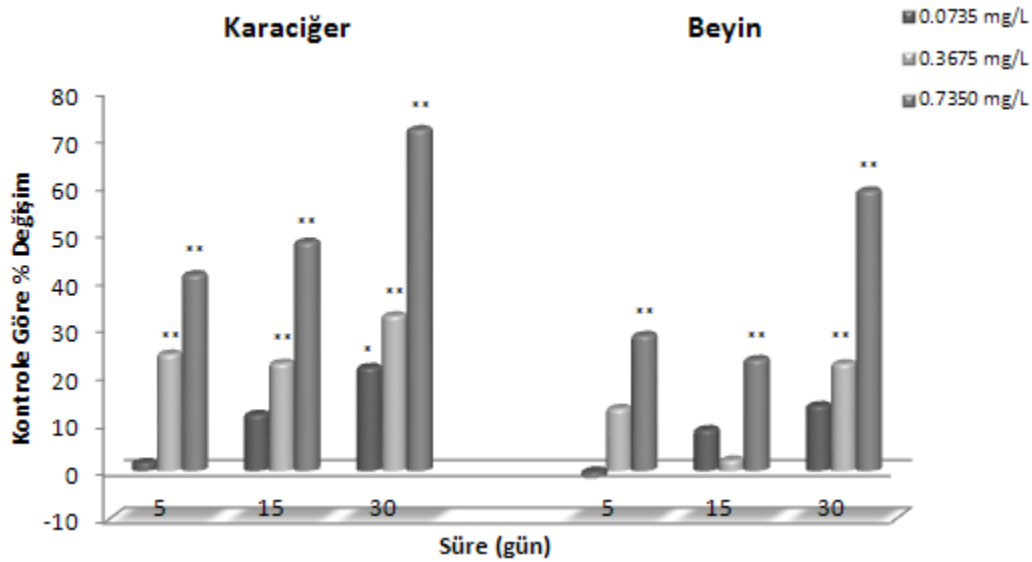
Beyin dokusunda MDA miktarları pestisit uygulamasının 5 ve 15. günlerinde sadece en

yüksek derişimde, uygulamanın 30. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde önemli oranda artış göstermiştir ( $p<0.01$ , Tablo 4.28). Belirlenen artışın derişimlerle ilişkili olmadığı ancak süre ile pozitif bir ilişkisinin olduğu saptanmıştır ( $r=0.743$ ,  $p<0.01$ ). MDA miktarında en belirgin artış dimethoate uygulamasının 30. günü 0.7350 mg/L derişimde %59.01 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11).

**Tablo 4.28.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Derişim (mg/L)	MDA (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	2.73±0.142ax	2.98±0.093ax	2.83±0.151ax
0.0735	2.69±0.201ax	3.24±0.255aby	3.22±0.087aby
0.3675	3.09±0.164abx	3.05±0.071ax	3.47±0.200bx*
0.7350	3.51±0.136bx*	3.68±0.190bx*	4.50±0.193cy*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.11.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında MDA miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \* $p<0.05$  ve \*\* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

#### 4.8. Protein Miktarına Etkisi

Karaciğer dokusunda uygulamanın 5. günü protein miktarında değişim olmazken ( $p>0.05$ ), denemelerin 15. ve 30. günlerinde tüm uygulama derişimlerinde süre ile



pozitif ilişkili bir azalma belirlenmiştir ( $r= 0.708$ ,  $p<0.01$ ). Protein miktarında belirlenen en yüksek azalma 15. ve 30. günlerde sırasıyla %37.56 ve %48.80'dir (Tablo 4.29, Şekil 4.12).

**Tablo 4.29.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te karaciğer dokusunda protein miktarına (mg) etkisi

Derişim (mg/L)	Protein (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	21.95±1.82ax	20.37±0.96ax	21.23±1.59ax
0.0735	19.06±1.77ax	15.82±0.43bx	15.96±1.32bx*
0.3675	18.81±2.82ax	14.96±1.27bxy*	13.21±1.45bcy*
0.7350	18.93±2.06ax	12.72±0.85by*	10.87±0.49cy*

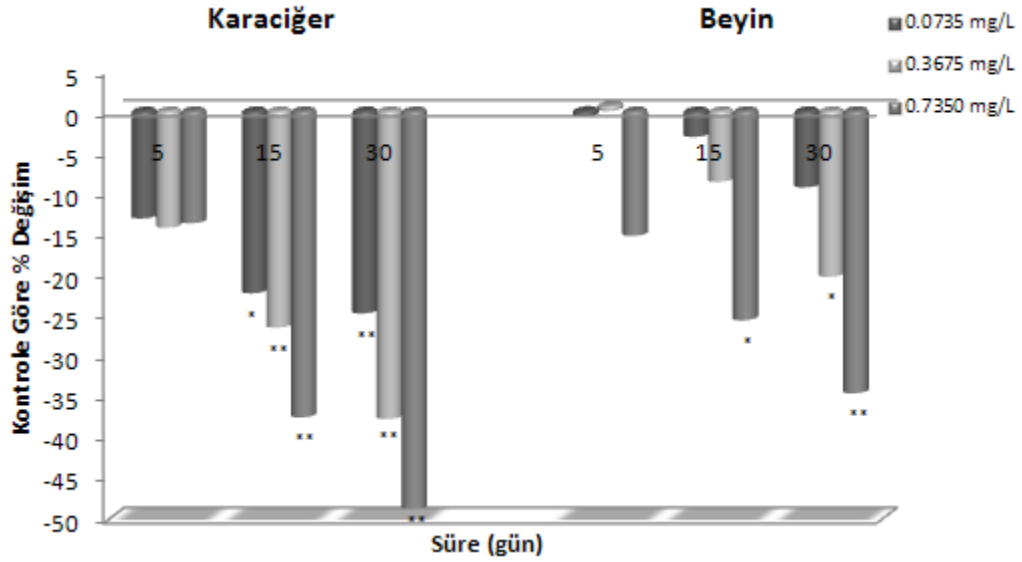
Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.

Beyin dokusunda 5. gün protein miktarında önemli bir değişim olmamıştır ( $p>0.05$ , Tablo 4.30). Dimethoate uygulamasının 15. günü en yüksek derişimde, 30. günü 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde süreye bağlı bir azalma belirlenmiştir ( $r=0.689$ ,  $p<0.01$ ). Protein miktarındaki en yüksek yüzde değişim, uygulamanın 30. günü 0.7350 mg/L derişimde %34.61 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.12).

**Tablo 4.30.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te beyin dokusunda protein miktarına (mg) etkisi

Derişim (mg/L)	Protein (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	7.71±0.526ax	7.95±0.109ax	8.12±0.100ax
0.0735	7.66±0.830ax	7.70±0.763ax	7.36±0.441abx
0.3675	7.76±0.809ax	7.26±0.626ax	6.47±0.198bcx
0.7350	6.53±0.784ax	5.91±0.273bx	5.31±0.526cx*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p<0.05$ , \* $p<0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.12.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında protein miktarının kontrole göre yüzde değişimi. \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  düzeyinde önemlidir.

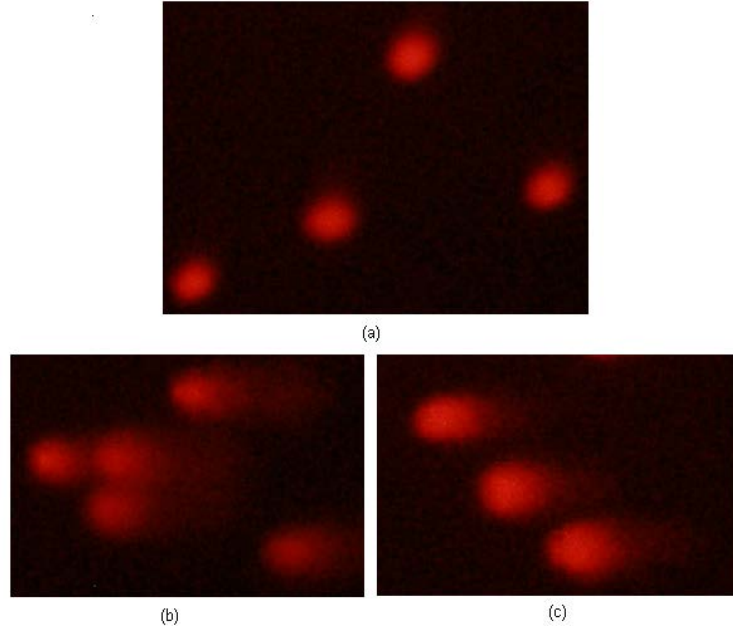
#### 4.9. DNA Hasarı

Görsel sınıflandırma yöntemi kullanılarak yapılan değerlendirmede dimethoate'nin uygulamanın 1. saati 0.7350 mg/L dışındaki tüm derişimlerde kontrole göre önemli oranda DNA hasarına neden olduğu saptanmıştır (Tablo 4.31,  $p < 0.01$ ). Uygulamanın 2. saati, DNA hasarının denenen tüm derişimlerde arttığı belirlenmiştir (Şekil, 4.13,  $p < 0.01$ ). Bu artışın pestisit derişimi ile veya deneme süreleri ile ilişkisinin olmadığı bulunmuştur.

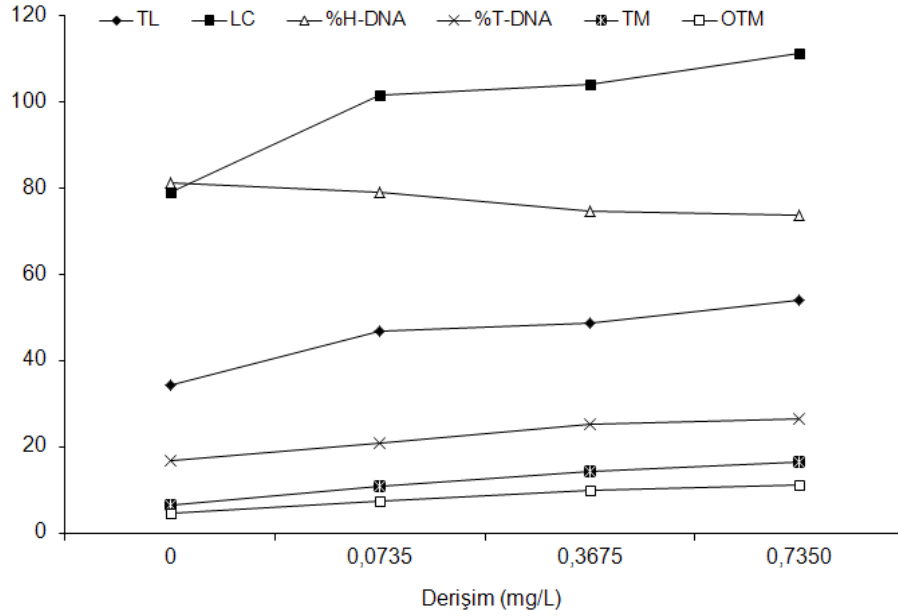
**Tablo 4.31.** Dimethoate'nin subletal derişimlerinde *O. mykiss* eritrositlerinde *in vitro* DNA hasarı.

Derişim (mg/L)	DNA Hasarı (arbitrary units, AU)	
	1. Saat	2. Saat
Kontrol	8.00±3.01ax	8.67±2.41ax
0.0735	162.67±51.72bx*	128.67±27.29bx*
0.3675	152.67±26.59bx*	159.33±36.81bx*
0.7350	46.00±13.32ax	132.67±36.04bx*

Değerler aritmetik ortalama ± standart hata olarak verilmektedir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler  $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$  düzeyinde önemlidir.



**Şekil 4.13.** *O. mykiss* eritrositlerinde (a) normal DNA hücresi, eritrositlerde dimethoate uygulamasından 1 saat (b) ve 2 saat (c) sonra DNA hasarı.



**Şekil 4.14.** Dimethoate etkisinde *O. mykiss* eritrositlerinde TL, LC, %H-DNA, %T-DNA, TM ve OTM'nin uygulama derişimlerine göre değişimleri.

*In vitro* dimethoate uygulamasının *O. mykiss* eritrositlerinde TL, LC, %H-DNA, %T-DNA, TM ve OTM değerlerine etkisi Tablo 4.32'de verilmektedir. %H-DNA'nın 1. saatte sadece 0.3675 mg/L derişimde, 2. saatte 0.3675 ve 0.7350 mg/L derişimlerde

kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir ( $p<0.01$ ). Diğer parametrelerde uygulamanın 1. saatinde 0.3675 mg/L derişimde belirlenen artış dışında, önemli bir değişim gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Ancak, 2 saat pestisit uygulamasından sonra tüm parametrelerde özellikle en yüksek pestisit derişiminde istatistiksel olarak önemli bir artış meydana gelmiştir ( $p<0.01$ ). Korelasyon analizi TM ve LC değerlerindeki artışın denenen dimethoate derişimleri ile pozitif ilişkili olduğunu göstermiştir ( $r=0.894$  ve  $r=0.906$ ,  $p<0.05$ ). DNA hasar parametrelerinin uygulamanın 2. saatinde doza bağlı değişimleri Şekil 4.14'te verilmektedir.

**Tablo 4.32.** Dimethoate'nin *O. mykiss*'te eritrositlerde TL, LC, %H-DNA, %T-DNA, TM ve OTM'ye etkisi.

Derişim (mg/L)	Süre (saat)	
	1	2
<b>TL (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Kontrol	47.20 $\pm$ 4.99ax	34.40 $\pm$ 6.68ay
0.0735	51.24 $\pm$ 1.95abx	46.72 $\pm$ 1.66bx*
0.3675	63.80 $\pm$ 4.85bx	48.66 $\pm$ 2.89by*
0.7350	44.20 $\pm$ 1.43ax	54.14 $\pm$ 3.53bx*
<b>LC (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Kontrol	101 $\pm$ 7.40ax	79 $\pm$ 7.46ay
0.0735	107.45 $\pm$ 4.47ax	101.49 $\pm$ 0.95bx*
0.3675	117.98 $\pm$ 4.48ax	103.92 $\pm$ 3.79bx*
0.7350	100.95 $\pm$ 1.76ax	111.16 $\pm$ 4.94bx*
<b>%H-DNA</b>		
Kontrol	79.80 $\pm$ 1.77ax	83.14 $\pm$ 2.70ax
0.0735	80.92 $\pm$ 1.06ax	79.03 $\pm$ 1.35abx
0.3675	67.31 $\pm$ 4.29bx*	74.57 $\pm$ 2.95bcx
0.7350	76.37 $\pm$ 3.02ax	73.61 $\pm$ 2.05cx*
<b>% T-DNA</b>		
Kontrol	20.16 $\pm$ 1.79ax	16.86 $\pm$ 2.70ax
0.0735	19.08 $\pm$ 1.06ax	20.98 $\pm$ 1.35abx
0.3675	32.41 $\pm$ 4.40bx*	25.32 $\pm$ 2.97bx
0.7350	20.30 $\pm$ 2.69ax	26.38 $\pm$ 2.06bx*
<b>TM (<math>\mu\text{m}</math>)</b>		
Kontrol	9.74 $\pm$ 1.67ax	6.44 $\pm$ 2.26ax
0.0735	10.57 $\pm$ 0.41ax	10.78 $\pm$ 1.14abx
0.3675	23.92 $\pm$ 5.54bx*	14.41 $\pm$ 2.54by
0.7350	11.77 $\pm$ 1.32ax	16.51 $\pm$ 2.22bx*
<b>OTM (AU)</b>		
Kontrol	7.54 $\pm$ 0.97ax	4.56 $\pm$ 1.05ax
0.0735	7.22 $\pm$ 0.36ax	7.45 $\pm$ 0.45abx
0.3675	14.29 $\pm$ 2.88bx*	10.00 $\pm$ 1.33bcy
0.7350	7.35 $\pm$ 0.42ax	11.19 $\pm$ 1.43cx*

Değerler aritmetik ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmektedir (n=3). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, \*p<0.01 düzeyinde önemlidir.

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Balıklar suda çözülmüş kirleticileri aktif veya pasif işlemlerle alma ve tutma özelliklerinden dolayı pestisitlerin etkilerine karşı özellikle duyarlıdırlar. Balıkların çevresel düşük pestisit düzeylerine yanıtları ile ilgili fizyolojik değişiklikler, sadece biyolojik açıdan çevre kirliliğinin düzeyinin anlaşılması için bir araç olmakla kalmaz, aynı zamanda insanlar dahil omurgalı canlıların toksisitesi için de model olarak kullanılabilir (Sancho vd., 2010).

Canlıların stres yanıtları adaptiftir ve genellikle çevrelerindeki değişiklikler ile baş etmesine yardımcı olmaktadır. Ancak, bazen stres yanıtında modifikasyonlar veya bundan kaynaklanan zararlı etkiler bireysel düzeyde ve nihayetinde popülasyon seviyesinde önemli derecede olumsuz sonuçlara neden olabilmektedir (Heath, 1995).

Kan parametrelerinin izlenmesi pestisit zehirlenmesinin erken uyarı sinyallerinin değerlendirilmesinde tanınan öneme sahiptir. Hematolojik parametreler kimyasal maddelere yanıtlarında spesifik olmamalarına rağmen, genel fizyoloji ve sağlık durumunun bir göstergesi olarak balıklarda toksik madde etkilerinin biyomarkırları olarak kullanılmaktadırlar (Van Der Oost vd., 2003).

Bu çalışmada, deney materyali olarak kullanılan *O. mykiss* (Gökkuşığı alabalığı)'de dimethoate uygulamasının 15 ve 30. günlerinde RBC, WBC, MCV ve MCH üzerinde azaltıcı bir etkinin meydana geldiği belirlenmiştir. Ayrıca, Hg ve HTC miktarlarında da 30 günlük uygulamadan sonra önemli azalma belirlenmiştir. Pestisit olarak molinate ve diazinon etkisinde sırasıyla *A. anguilla* ve *Silurus glanis* Linnaeus, 1758'de benzer bulgular elde edilmiştir (Sancho vd., 2000; Köprücü vd., 2006). Besinlerin, oksijenin, vücut atıklarının ve karbonik asit gazlarının taşınmasında ve atılmasından sorumlu olduğu için, aneminin ve kan üretiminin araştırılmasında eritrosit sayısının değerlendirilmesi önemlidir (Min ve Kang, 2008). Subletal derişimlerde cypermethrin ve carbofuran uygulamasından sonra *L. rohita*'da (Adhikari vd., 2004) chlorpyrifos etkisinde *C. carpio*'da eritrosit sayısının önemli oranda azaldığı bildirilmiştir (Ramesh ve

Saravanan, 2008). Cypermethrin uygulanan *L. rohita*'da hemoglobin miktarının azaldığı bildirilirken, gözlenen anemik durumun solungaçlarda ozmoregülasyonun bozulması nedeniyle hemodilüsyondan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Das ve Mukherjee, 2003). Dimethoate etkisinde RBC ve Hg miktarındaki azalma *O. mykiss*'te eritropeni ve stres kaynaklı hemolizin göstergesi olabilir. Toksik maddenin eritropoetik dokuda bozucu etkisi aneminin göstergesi olarak eritrosit sayısını ve hemoglobin miktarını azaltabilmektedir. John (2007) subletal derişimlerde metasytox ve Sevin'in kronik olarak uygulanmasından sonra *M. vittatus*'de benzer yanıtlar rapor etmiştir. Adhikari vd. (2004), *L. rohita*'da cypermethrin ve carbofuran uygulaması sonrası belirlenen aneminin, eritropoez ve hem sentezinin inhibisyonu ile hematopoetik organlarda eritrosit yıkım oranının artmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Lökosit sayısının azalması balığın mikrobiyal ya da bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunma kapasitesini kaybettiğini göstermektedir. Bu azalma ayrıca hidrolitik enzimler salan lökositlerin otolizisinden de kaynaklanabilmektedir (Rao 1999). Diğer yandan deltamethrin etkisinde *O. niloticus*'da toplam lökosit ve eritrosit sayısında belirlenen artış, pestisit dolaylı olarak immünolojik değişiklikleri tetiklemeyle açıklanmıştır (El-Sayed vd., 2007).

Metribuzin uygulaması *C. carpio*'da HCT ve Hb miktarlarında azalma ile sonuçlanmıştır. Bu azalma gaz transferini korumak için oksijen taşıma kapasitesini arttıran bir yanıt olarak yorumlanmış, solungaç lamellerinde su-kan engelinde meydana gelen değişimi gösterdiği belirtilmiştir (Velisek vd., 2009). HTC, MCV ve MCH'deki azalma balığın kimyasal stres etkisinde olduğunu ve bunun dokularda patolojik bir durumla sonuçlandığını açıkca göstermektedir. HTC azalması balığın anemi ya da hemodilüsyon yaşadığını göstermektedir (Wedemeyer vd., 1976). Kırmızı kan hücresi indeksleri dikkate alındığında, bu anemi mikrositik hipokromik anemi olarak sınıflandırılabilir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer bulgular endosulfan ve fosphamidon etkisinde *Barbus conchoni*us Hamilton-Buchanan, 1822'de (Gill vd., 1991) ve diazinon etkisinde *C. carpio*'da (Svoboda vd., 2001) da rapor edilmiştir.

Biyokimyasal parametrelerin çalışılması, toksikolojik değerlendirmelerde önemli bir yere sahiptir. Çünkü değişimler toksik madde klinik semtomplara yol açmadan önce gözlenmektedir. Pestisitler farklı enzimlerin aktivitelerini etkileyebilmektedirler. Tüm metabolik faaliyetler spesifik enzimlerle katalizlendiğinden bu enzimlerin normal

aktivitelerinde meydana gelecek değişimler balığın fizyolojisini bozmaktadır (John, 2007). Kanın kirleticilerle tetiklenen strese duyarlı olduğu ve belirli serum enzimlerinin doku hasarını tanımlamak üzere kullanılabilereği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Patil ve Kulkarni, 1993).

Transaminazlar amino grupların transferi ile amino asitler ve  $\alpha$ -ketoasitlerin dönüşümünü katalizleyen bir grup enzimdir. Bu doku spesifik enzimlerin aktivitelerindeki artış karaciğer hasarının tanısında kullanılmaktadır. Dimethoate, *O. mykiss*'de serum AST ve ALT enzim aktivitelerinde süreye bağlı bir indüksiyona neden olurken, ALP aktivitesini değiştirmemiştir. Yüksek transaminaz aktivitesi, pestisit stresi sırasında enerji krizi ile baş etmek üzere TCA döngüsüne amino asit girişi ile transaminasyon işleminin arttığını göstermektedir (Philip ve Rajasree, 1996). Genel olarak stresin transaminasyon yolunu indüklediği ileri sürülmektedir (Natarajan, 1985). Araştırmamızda dimethoate tarafından tetiklenen toksik stres yüksek transaminaz aktivitesi ile sonuçlanmıştır. Serumda transaminaz enzim aktivitelerinde değişiklik olması hücre membran permeabilitesinde önemli patolojik değişimleri göstermektedir. Hepatositler hasar gördüğünde, normalde sitozolde lokalize olan enzimler ekstrasellüler bölgeye salınmakta ve membran bozuklukları nedeniyle dolaşıma katılmaktadırlar (Ozer vd., 2008). Balıklarda aminotransferaz ve alkalen fosfataz aktivitesinde pestisit indüklü artış bildirilmiştir. Meydana gelen bu artış doğrudan pestisit karaciğere toksik etkisi ile ilişkilendirilmiştir (Agrahari vd., 2007; John, 2007). Kronik carbofuran uygulamasını takiben, monoseks *O. niloticus*'da ALT, AST ve ALP enzim aktivitelerinde başlangıçta artış sonra belirgin bir azalma saptanmış ve bu bulgular uygulama süresi ile paralel olarak gelişen hepatik nekroz ile desteklenmiştir (Soufy vd., 2007).

En karakterstik genel stres yanıtı kan glukoz seviyesindeki artıştır. Dimethoate uygulamasını takiben, *O. mykiss*'te serum glukoz derişimi artan bir eğilim göstermiştir. Bu artış pestisit stresi ile ortaya çıkan yüksek metabolik talep nedeniyle enerji sağlamak üzere glukoneogenezin artmasından kaynaklanabilmektedir. Bu sonuç, ayrıca solunum yetersizliğinin bir yanıtı olarak da görülebilmektedir (Chandrasekar ve Jayabalan, 1993). Stres sırasında katekolaminlerin sentezlendiği ve balıklarda glikojen rezervlerini tükettikleri bilinmektedir. Yüksek katekolamin sentezi glikogenolize neden olarak adenil siklaz sistemi yoluyla hiperglisemine neden olmaktadır. *O. niloticus*'da lindane uygulaması yüksek kan glukoz derişimi ile sonuçlanmıştır ve hiperglisemik durum glukokortikoidlerin ve katekolaminlerin pestisit etkisinde aşırı salgılanması ile karaciğer



ve kas dokularında glikoliz ile açıklanmıştır (Al-Kahem, 1996). Ansari ve Kumar (1988), alternatif bir mekanizma olarak dimethoate gibi kolinesteraz inhibitörlerinin pankreatik  $\beta$  hücrelerinin glukoz reseptörlerini bloke ederek onların yüksek glukoz seviyesine karşı inaktif olmalarına neden olduklarını ileri sürmüştür. Stres, değişen şartlara karşı oluşan homeostazisi tehdit eden bir yanıttır. Hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) eksenin ve sempatik otonomik sinir sisteminin aktivasyonu yoluyla hiperglisemiye neden olmaktadır. Stres indüklü hiperglisemi enerji talebini karşılamak üzere adaptif ve yararlı bir nörohormonal yanıt olarak kabul edilmektedir (Rahimi ve Abdollahi, 2007)

Husain vd. (1987) balıklarda ve memelilerde glukoz derişimindeki değişimin doğrudan pestisit zehirlenmesi ile ilgili olduğunu, hipergliseminin karaciğer glikojeninin yıkım hızının artması nedeniyle bozulan karbonhidrat metabolizmasının göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Agrahari vd. (2007) *C. punctatus*'ta monocrotophos uygulaması sonrası belirlenen hipoglisemik durumun stres indüklü hormon aracılıklı yanıtı yansıttığını, organofosforlu pestisit toksisitesinde karakteristik davranışlar olan yüksek aktivite ve kasılma sırasında kan glukozunun hızla kullanılmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Protein miktarının belirlenmesi hücrelerin fizyolojik durumlarının değerlendirilmesinde tanısal bir parametre olarak kullanılmaktadır. Dimethoate uygulaması *O. mykiss* serum, karaciğer ve beyin dokularında protein miktarının azalması ile sonuçlanmıştır. Cypermethrin etkisinde *C. batrachus*'ta (Begum, 2005), fenitrothion uygulamasından sonra *A. anguilla*'da (Sancho vd., 1998) da benzer bulgular rapor edilmiştir. Doku protein miktarının azalması genel bir stres yanıt olarak değerlendirerek, balığın stres şartlarına fizyolojik adaptasyon yeteneğini yansıttığını belirtilmiştir (Fernandez-Vega vd., 2002).

Hipoproteinemi genellikle balıklarda pestisit etkisinde meydana gelen bir durumdur (Luskova vd., 2002; Ogueji ve Auta, 2007). Organofosforlu pestisitlerin hücresel proteinleri doğrudan metillediği ve fosforillediği bilinmektedir (Wild, 1975). Protein eksikliğinde, plazma protein derişimini korumak üzere doku proteinlerinin parçalandığı ileri sürülmüştür (Shanmugam, 1977). Deltamethrin etkisinde *O. niloticus*'da belirlenen hipoproteinemik ve hipoglisemik durum, hepatik fonksiyon bozukluğu ve pestisitinin immün baskılayıcı etkisi ile açıklanmıştır (El-Sayed vd., 2007). Çoğu organizma

aminositlerin oksidasyonu ile enerji kaynağı olarak proteinleri kullanmaktadır. Sonuç olarak, protein düzeyinde belirlenen azalma dimethoate stresi ile baş etmek için artan enerji talebini karşılamak üzere azalan protein sentezi ve artan proteolitik aktivite ile açıklanabilmektedir. Neff (1985) stres sırasında besin alımının bozulmasının, homeostazisi sağlamak üzere yüksek enerji harcanmasının, doku tamiri ve detoksifikasyon mekanizmasının protein eksikliğine neden olabileceğini ileri sürmüştür.

Hemoliz sonrası plazma hacminde ve eritrosit sayısında azalmanın da serum protein yüzdesinde düşme ile sonuçlanabileceği ileri sürülmüştür (Das vd., 2004). Kısa süreli molinate uygulamasında sonra *A. anguilla*'da toplam serum protein düzeyinde belirlenen azalma doğrudan anemi ile ilişkilendirilmiştir (Sancho vd., 2000).

Pestisit etkisinde protein miktarında artış rapor edilen çalışmalar da mevcuttur. Braga da Fonseca vd. (2008) 2,4-D etkisinde *L. obtusidens* kas dokusunda ve Ogueji ve Auta (2007) lambda-cyhalothrin uygulanan *C. gariepinus*'da serumda protein miktarında belirlenen artışı, protein kaybını telafi edici bir mekanizma olarak protein sentezinin artması şeklinde açıklamışlardır.

Çok sayıda kimyasalın endokrin bozucu etkileri tanımlanmıştır. Yaşamımızdaki istenmeyen etkileri dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmektedir. Endokrin sistem üzerindeki olumsuz etkileri, çoğunlukla östrojenik veya anti östrojenik, reproduktif bozukluk ile gelişim düzensizliklerine neden olmaktadır (Indarto ve Izawa, 2001).

Gonad steroid hormonları ve onların reseptörleri eşey belirlenmesi ve ikincil eşey karakterlerin gelişimi gibi gelişimsel işlemlerde düzenleyici bir rol oynamaktadırlar (Gross vd., 2003). Sex (17 $\beta$ -estradiol ve testosteron) ve stres (kortizol) steroidlerin derişimleri hipotalamus-hipofiz (H-P) eksenini homonları, depolama ve hepatik degradasyon kontrolünde olan senteze bağlıdır. Agonistik veya antagonistik kimyasalların varlığı H-P eksenini üzerinde son ürün mekanizmasını değiştirerek plazma steroid derişimlerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle steroid derişimlerinin belirlenmesi endokrin bozucu kimyasalların etkilerinin duyarlı ve potansiyel göstergeleri olarak kullanılmaktadır (Guillette vd., 1999).

Walsh vd., (2000) *in vitro* fare hücre kültüründe dimethoate'nin steroidogenik akut düzenleyici (*StAR*) genin anlatımını bozarak steroidogenezi inhibe ettiğini

bildirmişlerdir. Bu araştırmada, dimethoate uygulaması *O. mykiss*'te testosteron seviyesinde bir değişime neden olmazken, 17 $\beta$ -estradiol düzeyinde 5 ve 15. günde önemli bir artışa ve 30. günde ise özellikle yüksek derişimlerde azalmaya neden olmuştur. Makynen vd. (2000) vinclozolin uygulanan ergin erkek *P. promelas*'da benzer sonuçlar bulmuşlar ve pestisit anti androjen olarak etki etmediği sonucuna varmışlardır. *C. auratus*'da atrazine uygulaması erkek balıklarda plazma estradiol seviyesinde artışa ve testosteron seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Araştırmacılar atrazinin aromataz aktivitesini stimüle edici etkisinin olduğunu ve testosteron-estradiol dönüşümünü arttırdığını ileri sürmüşlerdir (Spano vd., 2004).

Erkek balıklarda az miktarda estradiol bulunmasına karşın, karaciğerlerinde estradiol reseptörlerine sahiptirler (Kime, 2001). Plazmada androjenlerin azalması ve/veya estradiol düzeyinin artması erkek balıkların antiandrojenik ya da östrojenik ksenobiyotiklere maruz kaldığını göstermektedir (Milnes vd., 2006). 17 $\beta$ -estradiol düzeyindeki artış östrojen agonist olarak etki edebilen kimyasal maruziyetine işaret etmekte ve erkek *O. mykiss*'te belirlenen 17 $\beta$ -estradiol indüksiyonu dimethoate'nin östrojenik aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Uygulamanın 30. günü 17 $\beta$ -estradiol düzeyinde belirlenen azalma son ürün mekanizması ile hormon derişimini düzenleyen endokrin homeostaz mekanizmasının aktivasyonunun bir sonucu olabilir.

Östrojenler ve östrojenik etkiler (feminizasyon) üzerinde yoğunlaşılmasına rağmen, sucul ortamda androjenik ve antiandrojenik etkiye sahip kimyasalların varlığı da kanıtlanmıştır (Sumpter, 2005). Martinovic vd. (2008) vinclozolin'in *P. promelas*'da erkek ikincil eşey karakterlerinin anlatımını engelleyerek anti androjenik, Zhang ve Yin (2008) pentachlorophenol'ün *C. carassius*'ta testosteron seviyesinde artışa neden olarak androjenik etki mekanizması ile reproduktif başarıyı etkilediğini saptamışlardır.

Kortizol, glukokortikoid ve mineralokortikoid olarak fonksiyon görererek iç metabolizmayı ve elektrolit dengesini düzenleyen kortikosteroid bir hormondur. Stres altındaki balıkta nöroendokrin yanıt, yüksek kortizol derişimi ile karakterizedir. *O. mykiss*'te dimethoate uygulaması kortizol derişiminde doz ve süre bağımlı bir indüksiyon ile sonuçlanmıştır. Endrin etkisinde *Salmo gairdneri* Richardson, 1836 (Bennett ve Wolke, 1987) ve *O. mykiss*'te lindane etkisinde benzer bulgular bildirilmiştir (Aldegunde vd., 1999). Bu yanıt strese karşı koymak için adaptif bir yanıt olabilir. Ancak uzun süreli kirletici etkisinde kortizol miktarının indüksiyonu reproduktif ve

immün fonksiyonları bozabilmekte ve protein katabolizmasını stimüle ederek gelişimi olumsuz şekilde etkileyebilmektedir (Thomas, 2008).

Hipotalamus hipofiz interrenal (HPI) son ürünü olan kortizol stresle mücadelede gerekli olan metabolik ve iyonik ayarlamalarda anahtar rol oynamaktadır. Bu nedenle HPI ekseninin fonksiyonuna olumsuz etkilemekte ve hayvanın stres etkenine yanıt verme yeteneğini değiştirebilmektedir (Hontela, 1998). *Tilapia mossambicus* Peters, 1852'de atrazine'nin hidromineral dengesine olan olumsuz etkilerini açıkça kanıtlayan Prasad ve Reddy (1994), yüksek kortizol seviyesini pestisitlerin ozmotik kontrolü etkilemesi ile açıklamışlardır. Kortizolün hidromineral dengesindeki rolü bilinmektedir ve bu nedenle pestisit ve/veya kirleticiler tarafından tetiklenen ozmoregülasyon bozukluğu, başlıca ozmotik su girişinde artışa ve hidromineral dengesini düzenleme amacıyla kortizol düzeyinde artışa neden olmaktadır (Wendelaar Bonga, 1997).

Wedemeyer ve Yasutake (1977) çok düşük kortizol düzeylerinin ciddi stres nedeniyle interrenal yorgunluğun göstergesi olduğunu, buna karşın çok yüksek kortizol düzeylerinin ise balığın kronik ya da akut stres altında olduğunu belirttiğini ileri sürmüşlerdir. Kortizol normal metabolizmada temel düzenleyici rol oynadığından bireyin davranışını da etkilemektedir (Prosser, 1985). Ksenobiyotiklerin strese karşı kortizol yanıtı kontrol eden HPI eksenini etkileyerek normal balık davranışını değiştirdiği gösterilmiştir (Scott ve Sloman, 2004). Thangavel vd. (2005) dimecron uygulanan *Sarotherodon mossambicus* Peters, 1852'de düşük kortizol seviyesinin pestisit stresi altında metabolizma hızını düşük tutmak için adaptif bir stres yanıtı olarak önermişlerdir.

Kirletici maruziyetini ve karaciğer hastalıklarını tanımlamak için hepatosomatik indeks organ düzeyinde biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Dimethoate uygulaması uzun süreli uygulama sonrasında HSI'de azalma ile sonuçlanmıştır. Yi vd., (2007) uzun süreli alachlor uygulamasından sonra *C. auratus*'ta benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Adams ve Mclean (1985) kimyasal sınıfı, balığın türü ve yaşına bağlı olarak kirleticilerin karaciğer boyutunda artma veya azalmaya neden olabileceğini ileri sürmüştür. Kronik stres nedeniyle ya da stres altında beslenmenin düzensizleşmesi sonucunda enerjinin tükenmesi, enerji rezervlerinin kaybı ile korele olarak karaciğer kütlelerinde azalma ile sonuçlanabilir (Heath, 1995). Li vd. (2010) propiconazole uygulamasının *O. mykiss*'te HSI'de azalma ile sonuçlandığını ve pestisitlerin doğrudan metabolizmayı etkileyerek

balığın gelişimini ve genel durumunu olumsuz yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Ancak hipertrofi ve/veya hiperplazi nedeniyle HSI'de artış belirlenen çalışmalarda, karaciğer büyümesi ve kimyasal uygulaması arasında nedensel bir ilişki olduğu da ileri sürülmüştür (Gill vd., 1990). Paraquat etkisinde *O. niloticus*'da gözlenen yüksek HSI değerleri, biyotransformasyon enzimlerinin aktivitelerinde artışla açıklanmıştır (Figueiredo-Fernandes vd., 2006).

Kime (2001), dişi ve erkek balıklarda kirleticilerin etkilerinin en yaygın ölçüsünün GSI'de azalma olduğunu bildirmiştir. GSI'de değişim bozulmuş reproduktif kapasiteyi gösterdiğinden, önemli bir biyomarkır olarak kullanılmaktadır. Pestisit etkisine yanıt olarak GSI'de azalmanın rapor edildiği çalışmalar da mevcuttur. *H. fossilis*'te  $\gamma$ -HCH uygulamasından sonra GSI'de belirlenen önemli azalma gonad gelişiminin inhibe olması şeklinde yorumlanmıştır (Singh ve Canario, 2004). *O. mykiss*'te dimethoate etkisinde GSI'de değişim görülmemiştir. Sırasıyla o,p'-DDT and DDT etkisinde bırakılan *O. niloticus* ve *O. mossambicus*'da benzer bulgular rapor edilerek, belirtilen pestisitlerin endokrin bozucu fonksiyonlarının GSI değişimi ile meydana gelmediği sonucuna varılmıştır (Leanos-Castaneda vd., 2007; Mlambo vd., 2009).

AChE aktivitesindeki değişimler genellikle organofosforlu pestisit kirliliğinin biyomarkırı olarak kullanılmaktadır. Balık türlerinde, AChE aktivitesinde %20 inhibisyon organofosfat kirliliğinin göstergesi olarak değerlendirilirken, enzim aktivitesinde %70-85 üzerindeki inhibisyonun ölüm ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Fulton ve Key, 2001). Ancak yapılan çalışmalarda, yüksek düzeyde AChE inhibisyonunun her zaman toksik etkilerle ilişkili olmadığı gösterilmiştir. Propoxur/isoprocarb etkisinde *C. auratus* beyin dokusunda enzim aktivitesinde %90 oranında inhibisyon belirlenmiştir (Wang vd., 2009). Ferrari vd. (2004), azinphos methyl ve carbaryl ile yaptıkları çalışmada, kolinestraz inhibisyonu ile mortalite arasında lineer bir ilişki olmadığını, *O. mykiss*'in beyin dokusunda enzim aktivitesinin tam inhibisyonuna rağmen hayatta kaldığını bildirmişlerdir. Beyin dokusunda AChE aktivitesinin önemli oranda inhibisyonuna rağmen balıkların hayatta kalması hayvanların gerekenden çok daha fazla AChE aktivitesine sahip olması ile açıklanmıştır (Ansari vd., 1987).

Dimethoate etkisinde *O. mykiss*'te AChE aktivitesi karaciğer dokusunda süreye bağlı olarak %45-70, beyin dokusunda süre ve doza bağlı olarak %55-94 oranlarında

inhibisyon göstermiştir. Fenvalerate uygulamasının *C. mrigala*'da AChE aktivitesinin en yüksek yüzde ile beyin dokusunda olmakla birlikte karaciğer, solungaç ve kas dokularında inhibe olduğu belirtilmiştir. Bu bulgular dokularda belirlenen ACh birikimi ile desteklenerek, kolinerjik iletimin bozulduğu rapor edilmiştir (Mushigeri ve David, 2005).

Diğer organofosfatlar gibi, dimethoate da zayıf AChE inhibitörüdür ve toksisitesi başlıca metaboliti dimethoksondan kaynaklanmaktadır. Organofosforlu pestisitler sitokrom P<sub>450</sub> enzim sistemi tarafından aktive edilmekte ve türler arasında gözlenen duyarlılık farklılıkları detoksifikasyonda metabolik yollara ve atılım yeteneğine bağlı olarak değişmektedir. Bir kolinestrez inhibitörüne maruz kaldıktan sonra AChE inhibisyonunun süresi, organizmanın enzim aktivitesini geri kazanmasını ve doğal şartlarda hayatta kalma olasılığını etkilemektedir (Bretaud vd., 2002). Organofosfatlar AChE aktivitesini geri dönüşümsüz bir mekanizma ile inhibe ederler ve enzim aktivitesinin *de novo* AChE sentezine dayanan geri eldesi yavaştır (Ferrari vd., 2004).

Balıklar toksik madde etkisinde davranışsal etkilerin değerlendirilmesinde sucül ortamları doğrudan temasta olmaları ve birçok doğal sistemle ekolojik ilişkileri nedeniyle ideal hayvan modelidir (Kane vd., 2005). Kirletici etkisinde kirleticiden sakınma, beslenme faaliyetinde, üremede ve yüzme davranışlarında değişiklik gibi çeşitli hayvan davranışları izlenebilmektedir. Davranışsal yanıt vücut fonksiyonlarında iç rahatsızlıkların göstergesidir ve genellikle altta yatan biyokimyasal, morfolojik ya da fizyolojik bozuklukların toplam etkisidir. Bu nedenle çevre kirliliğinin biyokimyasal ve ekolojik sonuçlarını birleştirerek, bir seri toksik etkiyi ve bunu telafi edici yanıtları yansıtabilmektedir (Little ve Finger, 1990).

Balıklarda kirleticiler tarafından indüklenen davranışsal değişimler nörolojik, duyuşsal, metabolik ve endokrin bozulmasından kaynaklanabilmektedir (Scott ve Sloman, 2004). Nörolojik bozulma nörotransmitter seviyelerinin değişiminden (De Boeck vd., 1995; Smith vd., 1995), nörotransmisyon enzimlerinin inhibisyonundan (Suresh vd., 1992) ve antioksidanlar gibi koruyucu enzimlerin inhibisyonundan kaynaklanabilmektedir (Berntssen vd., 2003).

*O. mykiss*'te gözlenen davranışsal değişimler uygulamanın erken dönemlerinde meydana gelmiştir ve yüksek derişimlerde daha şiddetli gözlenmiştir. Metribuzin uygulamasından sonra *C. carpio*'da (Velisek vd., 2009) ve cypermethrin uygulamasını takiben *H.*

*fossilis*'te benzer bulgular bildirilmiştir (Saha ve Kaviraj, 2003). Endosulfanın etkisinde *M. albus*'ta önemli davranışsal anormallikler gözlenmiş ve bu değişimlerin pestisit indüklü nörotoksisiteden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Siang vd., 2007).

Davranışsal yanıtların spesifik olmaması nedeniyle, toksisite mekanizmalarının aydınlatılmasında biyokimyasal ve fizyolojik parametreler ile birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Spesifik bir etki tarzı olan organofosfatlı pestisit toksisitesinde, balıklarda AChE inhibisyonu ile davranış değişiklikleri arasındaki ilişki yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Fernandez-Vega vd., 2002, Xuereb vd., 2009). AChE aktivitesinin azalması besin arama, besin kokusuna yönelme, eş arama ve predatörleri engelleme gibi optomotor davranışları etkilemektedir (Pan ve Dutta, 1998). Merkezi sinir sisteminde ve nöromusküler bağlantılarda AChE'nin kolinerjik sinir iletimindeki rolü dikkate alındığında, diğer anti kolinesteraz pestisitler ile yapılan çalışmalarda da belirtildiği gibi (Brewer vd., 2001; Rao vd., 2006; Kavitha ve Rao, 2008; Ballesteros vd., 2009), *O. mykiss*'te gözlenen davranışsal değişimler dimethoate tarafından AChE enziminin büyük oranda inhibe edilmesinin bir sonucudur.

Diazinon etkisinde *A. anguilla*'da aktivitede artış ve kasılma görülmüş aşırı mukus salgıladıkları ve renklerinin donuklaştığı bildirilmiştir (Sancho vd., 1993). Mukus salgısı stres şartlarında balıklarda gözlenen ortak bir yanittir. Vücut ve toksik ortam arasında bir bariyer oluşturarak, kimyasalın tahriş edici etkilerini minimum düzeye indirmek üzere kimyasalla teması azalttığı ileri sürülmüştür (Marigoudar vd., 2009).

Biyomarkır indüksiyonu ile fizyolojik etkilerin meydana gelmesi arasındaki bağlantı moleküler düzeyde her zaman tam olarak anlaşılammamaktadır. Ancak metaller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organoklorlu ve organofosfatlı pestisitler ile poliklorinli bifeniller gibi farklı kimyasallar sucül ortamda oksidatif strese neden olmaktadır. Oksidatif stres biyomarkırları hayatta kalma veya üreme ile ilgili diğer parametrelerle birlikte ele alındığında, olumsuz fizyolojik etkilerin, ortamdaki bu tip kirleticilerin varlığı ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (Lerner vd., 2007).

Dimethoate uygulaması *O. mykiss* karaciğer dokusunda antioksidan enzimler SOD, CAT ve GPx aktivilerinde bifazik bir yanıtı neden olmuştur. Enzim aktivitelerinde uygulamanın 15. gününe kadar gözlenen artış, uygulama sonunda belirgin azalma ile kendini göstermiştir. Beyin dokusunda ise CAT aktivitesi değişmezken, SOD aktivitesinin ilk indüksiyondan sonra kontrol düzeyinde olduğu belirlenmiş, GPx

aktivitesi ise uygulamanın 15 ve 30. günlerinde artış göstermiştir. Her iki dokuda da lipid peroksidasyonunun uygulama süresi ile doğru orantılı olarak arttığı saptanmıştır.

Kimyasal stresine yanıtta antioksidan enzim aktivitelerinde artış olması kesin bir kural değildir; uygulama süresine, derişimlere ve test organizmasının duyarlılığına göre aktivitede indüksiyon ve inhibisyon meydana gelebilmektedir (Cheung vd., 2001). Li vd. (2010) carbamazepine etkisinde *O. mykiss* beyin dokusunda elde ettikleri sonuçları adaptif aşama ve inhibe edici aşama olarak iki fazda sınıflandırarak, kısa süreli uygulamanın antioksidan enzimlerin indüksiyonu yoluyla adaptasyonla sonuçlandığını, ancak uzun süreli uygulama sonrası pestisit beyin dokusunda önemli oksidatif hasara neden olduğunu bildirmişlerdir.

Hücrelerdeki reaktif oksijen türleri, savunma mekanizması olarak antoksidan enzimlerde artışa neden olabilmektedir. SOD, süperoksit anyonun su ve  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu katalizlemekte, oluşan  $H_2O_2$  CAT ve GPx enzimlerince detoksifiye edilmektedir. Bu enzimlerin aktivitelerindeki artış toksik strese bir yanıtıdır ve reaktif oksijen türlerin oluşumunu nötralize etmeye çalışmaktadır (Sies, 1986). Dimethoate etkisinde SOD aktivitesinde belirlenen artışın, pestisit indüklü süperoksit anyon üretimine doğrudan bir yanıt olarak oluştuğu düşünülmektedir. Karaciğer dokusunda CAT ve GPx enzimleri benzer biçimde yanıt vermekte ve hücrel  $H_2O_2$  üretimindeki değişimi yansıtmaktadır. Beyin dokusunda GPx aktivitesindeki artışın doza bağlı olarak devam etmesi,  $H_2O_2$ 'ye ek olarak GPx'in membran lipidlerinin peroksidasyonu ile üretilen lipid hidroperoksitlerin toksisitesine karşı koruma sağlamasından kaynaklanmaktadır. SOD aktivitesi ile  $H_2O_2$  üretimi sınırlandırıldığında, hidroperoksid radikal döngüsünün sonlanma reaksiyonunun yavaşlayarak hidroksil radikal birikimine neden olduğu ve lipid peroksidasyonunu tetiklediği ileri sürülmüştür (Michiels vd., 1994). *O. mykiss*'te her iki dokuda da süreye bağlı olarak lipid peroksidasyonunda kaydedilen artış hücrel SOD aktivitesinde saptanan azalma ile uyumludur. Bu nedenle GPx aktivitesinde belirlenen indüksiyon, aşırı lipid hidroperoksid radikal üretimine bir yanıt olarak meydana gelmektedir.

Antioksidan enzim aktivitelerinde belirlenen artış enzim miktarının değişmesinden (protein sentezi veya parçalanma) veya posttranslasyonel kovalent modifikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Antioksidan enzimlerin çoğunun posttranslasyonel regülasyona tabi olmadığı bilindiğinden, dimethoate etkisinde indüklenen enzim aktivitesi yüksek



transkripsiyon ve/veya translasyondan kaynaklanmaktadır (Lushchak vd., 2005).

*O. mykiss* karaciğer ve beyin dokularında bazal enzim düzeylerinde ve dimethoate toksisitesine yanıtlarında farklılıklar belirlenmiştir. Beyin dokusunun düşük antioksidan kapasitesi ve yüksek doymamış yağ asidi içeriği nedeniyle reaktif oksijen türlerine daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Mates, 2000). Ancak karaciğer, ksenobiyotiklerin ve farklı toksik metabolitlerin detoksifikasyonunda temel organ olduğundan, yüksek metabolizma ve oksijen tüketimine sahip olmakta ve organizmalarda muhtemelen antioksidan savunma durumunu en iyi biçimde yansıtmaktadır (Wilhelm-Filho vd., 1993). *C. carpio* karaciğer dokusunda SOD aktivitesinde başlangıç indüksiyonunu takiben kaydedilen azalma, hexachlorobenzene (HCB) indüklü oksidatif stres nedeniyle oluşan reaktif türlerin antioksidan kapasitesini aşması şeklinde yorumlanmıştır. Aynı çalışmada beyin dokusunda artan lipid peroksidasyonuna paralel olarak GPx aktivitesinin arttığı bildirilerek, beyin dokusunun toksisiteye karaciğer dokusundan daha duyarlı olduğu ileri sürülmüştür (Song vd., 2006).

Hücre hasarının iyi tanımlanmış mekanizmalarından biri olan lipid peroksidasyonu, hücrelerde ve dokularda oksidatif stres biyomarkırı olarak kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu sırasında üretilen reaktif aldehitler, serbest radikallerin aksine üretildikleri yerden difüze olabilmekte ve hücre içi ve hücre dışı hedeflere ulaşarak hasar verebilmektedirler (Esterbauer vd., 1990). Organofosforlu pestisitler doğrudan hücre plazma membranı ile etkileşerek lipid peroksidasyonuna neden olabilmektedirler (Hai vd., 1997). Ancak AChE inhibitörü tarafından tetiklenen kolinerjik hiperaktivitenin serbest radikal birikimi yoluyla lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve bu mekanizmanın AChE inhibitörünce indüklenen hücre hasarının başlangıç aşaması olabileceği ileri sürülmüştür (Yang vd., 1996). *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında lipid peroksidasyonunda belirlenen artış, dimethoate etkisi ile üretilen reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzimlerce tam olarak giderilemediğini göstermektedir. Modesto ve Martinez (2010), roundup uygulamasının *P. lineatus*'in karaciğer dokusunda baskılanan antioksidan enzim aktiviteleri ile paralel olarak lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğunu belirterek, antioksidan savunma biyotransformasyon işlemi sırasında üretilen reaktif türleri etkisiz hale getirmek için yeterli olmadığından oksidatif stresin oluştuğunu rapor etmişlerdir.

Tek hücre jel elektroforezi hücrelerin mitotik olarak aktif olmalarını gerektirmediğinden

diğer geleneksel sitogenetik yöntemlere göre avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, comet analizi genetik toksikoloji ve çevresel izleme alanlarında DNA hasarı ve akuatik organizmaların genetik kirleticilere maruz kalması arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. *O. mykiss* eritrositlerinde *in vitro* dimethoate uygulamasından sonra gözlenen yüksek DNA hasar düzeyi, diğer araştırmalar ile paralellik göstermekte (Ventura vd., 2008; Nwani vd., 2010) ve balık eritrositleri kullanılarak uygulanan comet analizinin kimyasalların genotoksik etkilerini belirlemede etkili olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, artan dimethoate derişimi ile TM ve LC arasında bulunan pozitif korelasyon, TM ve LC'yi DNA hasarını daha hassas biçimde yansıtan parametreler olarak değerlendirmemize neden olmuştur.

Kimyasal olarak organofosforlu pestisitler alkilleyici ajanlardır. Protein alkilasyonu yoluyla DNA bazlarının doğrudan ya da dolaylı olarak alkilasyonu DNA hasar mekanizması içinde yer almaktadır (Wild, 1975). DNA'daki elektronca zengin atomlar elektrofiller tarafından saldırıya açıktır ve metil, etil veya alkil gruplarının transferi mutajenik ve klastojenik etkilere neden olan fosforilasyon veya alkilasyon ile sonuçlanabilmektedir (Jayashree vd., 1992). Genotoksik bileşiklerin doğrudan etkilerinin ve oksijen radikaller veya reaktif arabileşikler ile etkileşimlerinin de iplik kırıklarına neden olduğu bilinmektedir (Eastman ve Barry, 1992). Organofosforlu bir pestisit olarak dimethoate toksik etkilerini göstermek için metabolik aktivasyona ihtiyaç duymaktadır, ancak orgafosfatlarla yürütülen *in vitro* çalışmalarda oksidatif stresin indüklendiği ve DNA hasarında artış olduğu rapor edilmiştir (Gültekin vd., 2000; Parra vd., 2010). Cavalcante vd. (2008), *P. lineatus* eritrositlerinde roundup uygulaması sonrası belirlenen yüksek DNA hasarını herbisitinin metabolizması sırasında üretilen reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile açıklayarak, reaktif türlerin DNA ile etkileşimlerinin comet analizinde belirlenen lezyonlara neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada cypermethrin *Danio rerio* Hamilton, 1822 hepatositlerinde kuyruk momenti ve Olive kuyruk momentinde doza bağlı bir artışa neden olmuştur ve bu bulgular karaciğer dokusunda tetiklenen oksidatif stres ile desteklenerek oksidatif DNA hasarı şeklinde yorumlanmıştır (Jin vd., 2010). *O. mykiss* eritrositlerinde dimethoate'nin DNA'ya hasar verici etkisi değişen antioksidan enzim aktiviteleri ve artan lipid peroksidasyonu ile kanıtlandığı üzere pestisitinin oksidatif stresi indüklemeye potansiyeli ve elektrofilik yapısı nedeniyle alkilleyici özelliği ile açıklanabilmektedir.

## BÖLÜM 6

### SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Dimethoate toksisitesi nedeniyle gözlenen hiperglisemik ve hipoproteinemik tablonun, *O. mykiss*'te davranışsal değişimlerle desteklendiği gibi yüksek metabolik talebi karşılamak üzere meydana gelen adaptif yanıtlar olduğu düşünülmektedir.
2. Kan profili, dimethoate uygulamasının *O. mykiss*'te özellikle uzun süreli uygulama sonrası anemiye neden olduğunu göstermektedir. Bu etki dimethoate'nin eritropoetik doku üzerindeki hücre canlılığını etkileyen bozucu etkisinden kaynaklanmaktadır.
3. Serumda belirlenen enzim aktivite sonuçları dimethoate'nin toksik etkilerini doğrudan karaciğer üzerinde gösterdiğini ve hücre membran permeabilitesinin bozulduğunu ortaya koymaktadır.
4. Dimethoate *O. mykiss*'te anti-androjenik etki göstermemiştir. Ancak bir östrojen agonist gibi etki ederek ve 17 $\beta$ -estradiol seviyesinde belirlenen değişimle kanıtlandığı üzere H-P ekseninde son ürün inhibisyonunu değiştirerek endokrin bozucu etki göstermektedir.
5. Kortizol seviyesinde zamana ve derişime bağlı olarak gözlenen artış genel bir adaptif yanıt olarak meydana gelmektedir.
6. HSI'de belirlenen azalma dimethoate stresine karşı artan metabolik talep nedeniyle enerji rezervlerinin kaybindan kaynaklanabilmektedir.
7. Dimethoate nörotoksitesininin temeli pestisitinin antikolinesteraz ajan olarak etki göstermesinden kaynaklanmaktadır. Ancak çalışma bulguları ele alındığında AChE inhibisyonu ile lipid peroksidasyonu arasında belirlenen ilişki, dimethoate indüklü peroksidatif hasarın da pestisitinin toksisitesine aracılık edebileceğini göstermektedir.

8. *O. mykiss*'te karaciğer ve beyin dokularında antioksidan enzimlerde belirlenen artışa rağmen, lipid peroksidasyonunda gözlenen süreye bağlı artış, dimethoate etkisi ile üretilen reaktif oksijen türlerinin antioksidan enzimlerce etkisizleştirilemediğini göstermektedir.

9. *O. mykiss* eritrositlerinde *in vitro* yürütülen Comet analizi, dimethoate'nin reaktif oksijen türlerin üretimini indükleyerek ve/veya alkilleyici özelliği nedeniyle DNA ile doğrudan etkileşerek genotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

10. Dimethoate'nin *O. mykiss*'te hematolojik, biyokimyasal ve genotoksik etkileri ile nörotoksisite ve endokrin bozucu potansiyeli bir arada ilk kez bu çalışma ile değerlendirilmiştir. Farklı toksisite biyomarkırlarının birlikte incelenmesinin, kimyasalın toksik profilinin değerlendirilmesinde daha anlamlı sonuçlar elde edilmesine yardımcı olduğu ve subletal derişimlerde *O. mykiss*'te belirlenen yanıtlar dikkate alındığında, dimethoate'nin oldukça toksik olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Abou-Donia, M.B. (1995). Organophosphorus pesticides. In L.W. Chang & R.S. Dyer (Eds.), *Handbook of Toxicology*, Marcel Dekker, NY, pp. 419-473.
- Abreu, I.A. and Cabelli, D.E. (2010). Superoxide dismutases—a review of the metal-associated mechanistic variations. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1804**, 263–274.
- ACP (2003). A guide to pesticide regulation in the UK and the role of the advisory committee on pesticides. Department for Environment, Food and Rural Affairs and Health and Safety Executive, ACP 14 (299/2003).
- Adams, S.M. and McLean, R.B. (1985). Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacepède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, **26**, 111– 126.
- Adedeji, O. B., Adeyemo, O. K. and Agbede, S. A. (2009). Effects of diazinon on blood parameters in the African catfish (*Clarias gariepinus*). *African Journal of Biotechnology*, **8**, 3940-3946.
- Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C. T. and Ayyappan, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**, 220-226.
- Agrahari, S., Pandey, K.C. and Gopal, K. (2007). Biochemical alteration induced by monocrotophos in the blood plasma of fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 268–272.
- Ahmad, S. (1995). Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins. In S. Ahmad (Ed.) *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman & Hall, America, pp. 238-265.

- Aldegunde, M., Soengas, J.L., Ruibal, C. and Andres, M.D. (1999). Effects of chronic exposure to  $\gamma$ -HCH (Lindane) on brain serotonergic and gabaergic systems, and serum cortisol and thyroxine levels of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **20**, 325–330.
- Ali, D. and Kumar, S. (2008). Long-term genotoxic effect of monocrotophos in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Science of the Total Environment*, **405**, 345-350.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Lakra, W.S. (2009). Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 650–656.
- Al-Kahem, H. F. (1996). Effects of lethal and sublethal concentrations of lindane on the behaviour and energy reserves of the freshwater fish, *Oreochromis niloticus*. *Journal of King Saud University – Science*, **8**, 153-164.
- Ansari, B.A., Aslam, M. and Kumar, K. (1987). Diazinon toxicity: activities of acetylcholinesterases and phosphatases in the nervous tissue of zebra fish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **15**, 301-306.
- Ansari, B.A. and Kumar, K. (1988). Cypermethrin toxicity: effect on the carbohydrate metabolism of the indian catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Science of the Total Environment*, **72**, 161-166.
- APHA, AWWA, WPCF (1980). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington, DC.
- Astiz, M., Hurtado de Catalfo, G.E., Alaniz, M.J.T. and Marra, C.A. (2009). Involvement of lipids in dimethoate-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat interstitial cells. *Lipids*, **44**, 703–718.
- Ateeq, B., Farah, M.A. and Ahmad, W. (2005). Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*.

- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Díaz, M.P., Bistoni, M.A. and Wunderlin, D.A. (2009). Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution*, **157**, 1573–1580.
- Banu, S. B., Danadevi, K., Rahman, M.F, Ahuja, Y.R. and Kaiser, J. (2001). Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 361-366.
- Begum, G. (2005). *In vivo* biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **82**, 185–196.
- Begum, G. (2009). Toxicity of dimethoate to aquatic organisms: a biochemical and bioaccumulation study. [http://www.scitopics.com/Toxicity\\_of\\_dimethoate\\_to\\_aquatic\\_organisms\\_A\\_Biochemical\\_and\\_Bioaccumulation\\_study.html](http://www.scitopics.com/Toxicity_of_dimethoate_to_aquatic_organisms_A_Biochemical_and_Bioaccumulation_study.html)
- Begum, G. and Vijayaraghavan, S. (1996). Alterations in protein metabolism of muscle tissue in the fish *Clarias batrachus* (Linn) by commercial grade dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 223-228.
- Bennett, R.O. and Wolke, R.E. (1987). The effect of sublethal endrin exposure on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. 1. Evaluation of serum cortisol concentrations and immune responsiveness. *Journal of Fish Biology*, **31**, 375-385.
- Berntssen, M.H.G., Aatland, A. and Handy, R.D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Aquatic Toxicology*, **65**, 55–72.
- Beutler, E. (1984). *Red cell metabolism*. (2<sup>nd</sup> ed.). Grune & Staron, New York.

- Bone, Q., Marshall, N.B. and Blaxter, J.H.S. (1995). *Biology of fishes*. Chapman and Hall, New York.
- Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Fernanda do Amaral, R.Z., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F. (2007). Changes in hematological and serum biochemical values in jundia *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. *Chemosphere*, **69**, 920–926.
- Braga da Fonseca, M., Glusczak, L., Moraes, B.S., Cavalheiro de Menezes, C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F. and Loro, V.L. (2008). The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **69**, 416–420.
- Brethead, S., Saglio, P., Saligaut, C. and Auperin, B. (2002). Biochemical and behavioral effect of carbofuran in goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 175–181.
- Brewer, S.K., Little, E.E., DeLonay, A.J., Beauvais, S.L., Jones, S.B. and Ellersieck, M.R. (2001). Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**, 70–76.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R. and Sofia, S.H. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, **655**, 41–46.
- Chambers, J. E. and Chambers, H. W. (1991). Biotransformation of organophosphorus insecticides in mammals: Relationship to acute toxicity. In L. Somasundaram & J. R. Coats (Eds.), *Pesticide Transformation Products: Fate and Significance in the Environment*, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 32–42.
- Champe, P.C., Harvey, R.A. and Ferrier, D.R. (2005). *Lippincott's illustrated reviews: biochemistry*. (3<sup>rd</sup> ed.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.



- Chandrasekar, S. and Jayabalan, N. (1993). Hematological responses of the common carp, *Cyprinus carpio* L. exposed to the pesticide endosulfan. *Asian Fisheries Science*, **6**, 331-340.
- Chatterjee, S., Dasmahapatra, A.K. and Ghosh, R. (2001). Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **129**, 265-273.
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Li, A.M.Y., Richardson, B.J. and Lam, P.K.S. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*, **52**, 189-203.
- Cohen, G.M. (1986). Basic principles of target organ toxicity. In, G.M. Cohen (Ed.), *Target Organ Toxicity*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroğlu, M. and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB Journal*, **17**, 1195–1214.
- Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, dos S. D., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R. and Loro, V.L. (2007). Effects of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver satfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere*, **67**, 2305-2311.
- Das, B.K. and Mukherjee, S.C. (2000). Sublethal effects of quinalphos on selected blood parameters of *Labeo rohita* (Ham) fingerlings. *Asian Fisheries Science*, **13**, 225-233.
- Das, B.K. and Mukherjee, S.C. (2003). Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **134**, 109-121.

- Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K. and Das, B.K. (2004). Effect of sublethal nitrite toxicity on the haematological parameters of fingerlings of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Indian Journal of Fish*, **51**, 287-297.
- David, M.S., Mushigeri, B., Shivakumar, R. and Philip, G. H. (2004). Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. *Chemosphere*, **56**, 347-352.
- De Boeck, G., Nilsson, G.E., Elofsson, U., Vlaeminck, A. and Blust, R. (1995). Brain monoamine levels and energy status in common carp (*Cyprinus carpio*) after exposure to sublethal levels of copper. *Aquatic Toxicology*, **33**, 265–277.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R. and Giesy, J.P. ( 2000). Biomarker applications to ecotoxicology: Bridging the gap between toxicology and ecology. In G. Persoone, C.R. Janssen and W.M. De Coen (Eds.), *New Microbial Test for Routine Screening and Biomonitoring*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp. 23–26.
- Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E. (2008). *The toxicology of fishes*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Dikilitas, M., Kocyigit, A. and Yigit, F. (2009). A molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi. *African Journal of Biotechnology*, **8**, 3118-3127.
- Dinçer, Y. ve Kankaya, S. (2010). DNA hasarının belirlenmesinde comet assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, **30**, 1365-1373.
- Dix, K.J. (2001). Absorption, distribution and pharmacokinetics. In R. Krieger (Ed.). *Handbook of Pesticide Toxicology: Principles*, Academic Press, California, USA.

- Dutta, H.M. (1996). A composite approach for evaluation of effects of pesticides on fish. In J.S.D. Munshi and H.M. Dutta (Eds.), *Fish Morphology*, Science Publishers' Inc., India.
- Eastman, A. and Barry, M.A. (1992). The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Investigation*, **10**, 229–240.
- Efferth, T. and Kaina, B. (2008). Chemical carcinogenesis: genotoxic and nongenotoxic mechanisms. In H. Greim and R. Snyder (Eds.). *Toxicology and Risk Assessment: A Comprehensive Introduction*, John Wiley & Sons Ltd., England.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, **7**, 88-95.
- El-Sayed, Y.S., Saad, T.T. and El-Bahr, S.M. (2007). Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **24**, 212–217.
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1997). Water pollution prevention and conservation. Pollution Prevention (P2) Education Toolbox. EPA-905-F-97-011 August.
- Esterbauer, H., Zollner, H. and Schaur, R.J. (1990). Aldehydes formed by lipid peroxidation: mechanisms of formation, occurrence, and determination. In C. Vigo-Pelfrey (Ed.). *Membrane lipid oxidation*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- FAO/WHO (1967). Evaluation of some pesticide residues in food. Dimethoate. 1967 Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. *WHO Food Additives Series 68.30*. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization: Rome.

- FAO/WHO (1980). Data sheet on pesticides, No. 42-Dimethoate. World Health Organization, Geneva.
- Fernandez-Vega, C., Sancho, E., Ferrando, M. D. and Andreu, E. (2002). Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **72**, 55-63.
- Ferrari, A., Anguiano, O.L., Soleño, J., Venturino, A. and de D'Angelo, A.M.P. (2004). Different susceptibility of two aquatic vertebrates (*Oncorhynchus mykiss* and *Bufo arenarum*) to azinphos methyl and carbaryl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **139**, 239-243.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontáinhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E. and Reis-Henriques, M.A. (2006). Effect of paraquat on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* at two levels of temperature. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **85**, 97-103.
- Frenzilli, G., Nigro, M. and Lyons, B.P. (2009). The comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, **681**, 80–92.
- Fukuto, T.R., (1990). Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*, **87**, 245–254.
- Fulton, M.H. and Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**, 37–45.
- Gedic, C.M., Ewen, S.W.B. and Collins, A.R. (1992). Single cell gel electrophoresis applied to analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology*, **62**, 313–320.
- Gill, T.S., Pande, J and Tewari, H. (1991). Effects of endosulfan on the blood and organ chemistry of freshwater fish, (*Barbus conchoniuis*) Hamilton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **21**, 80-91.

- Gill, T.S., Pande, J. and Tewari, H. (1990). Sublethal effects of an organophosphorus insecticide on certain metabolite levels in a freshwater fish, *Puntius conchoni* hamilton. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **36**, 290-299.
- Grimaldi, E. and Scopacasa, F. (1998). Evaluation of the Beckman-Coulter® GEN-S™ hematology analyzer. *Laboratory Hematology*, **4**, 264-268.
- Gross, T.S., Arnold, B.S., Sepúlveda, M.S. and McDonald, K. (2003). Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents. In: D.J. Hoffman, B. Rattner, G.A. Jr. Burton, J. Jr. Cairns (Eds.), *Handbook of Ecotoxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 1033-1098.
- Guillette, L.J., Rooney, A.A., Crain, D.A. and Orlando, E.E. (1999). Steroid hormones as biomarkers of endocrine disruption in wildlife. In: D.S. Henshel, M.C. Black, M.C. Harrass (Eds.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*, West Conshohocken, PA, pp. 254-270.
- Gultekin, F., Ozturk, M. and Akdogan, M. (2000). The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (*in vitro*). *Archives of Toxicology*, **74**, 533-538.
- Hai, D.Q, Varga, S.I. and Matcovics B. (1997). Organophosphate effects on antioxidant system of carp (*Cyprinus carpio*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **117**, 83-88.
- Halappa, R. and David, M. (2009). Behavioural responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **9**, 233-238.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press Inc. New York.
- Hamed, R.R., Elawa, Sh.E., Farid, N.M. and Ataya, F.Sh. (1999). Evaluation of detoxification enzyme levels in egyptian catfish, *Clarias lazera*, exposed to dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*,

- Heath, A. G. (1995). *Water pollution and fish physiology*. (2<sup>nd</sup> ed.), CRC Press, New York.
- Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In K.B. Storey (Ed.). *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*, Wiley-Liss Inc. Hoboken, New Jersey.
- Hontela, A. (1998). Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 44-48.
- Horton, A.A. and Fairhurst, S. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, **18**, 27-79.
- <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/cholinesterase/images/acetylcholinesterase.png>
- Husain, K., Ansari, R.A. and Gupta, P.K. (1987). Effect of subchronic exposure of malathion on blood and tissue enzyme activities in female rats. *Journal of Environmental Biology*, **8**,137–142.
- Indarto, D. and Izawa, M. (2001). Steroid hormones and endocrine disruptors: recent advances in receptor–mediated actions. *Yonago Acta Medica*, **44**, 1–6.
- IPCS (1989). Dimethoate. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 90).
- Isik, I. and Çelik, I. (2008). Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **92**, 38-42.
- Jalabert, B., Baroiller, J.F., Breton, B., Fostier, A., Gac, F. La, Guiguen, Y. and Monod, G. (2000). Main neuroendocrine, endocrine, and paracrine regulations of fish reproduction and vulnerability to xenobiotics. *Ecotoxicology*,**9**,25-40.
- Jayashree, I.V., Vijayalaxmi, K.K. and Rahiman, A. (1992). Genotoxicity of hinosan, an organophosphorous pesticide in the *in vivo* mouse. *Mutation Research*,

- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W. and Fu, Z. (2010). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, In Press, Corrected Proof.
- John, P.J. (2007). Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to metasystox and sevin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **33**, 15-20.
- Johnson, W.W. and Finley, M.T. (1980). Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service Resource Publication 137, Washington, DC.
- Jyothi, B. and Narayan, G. (1999). Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* Linn. *Food and Chemical Toxicology*, **37**, 417-421.
- Kane, A.S., Salierno, J.D. and Brewer, S.K. (2005). Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In G.K. Ostrander (Ed). *Methods in aquatic toxicology*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W. and Bruss, M.L. (1997). *Clinical biochemistry of domestic animals*. (5<sup>th</sup> ed.), Academic Press, San Diego, California, USA.
- Kavitha, P. and Rao J.V. (2008). Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**, 192-198.
- Kelly, S.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H. and Levin, E.D., (1998). Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, **106**,375-384.

- Khopkar, S. M. (2004). *Environmental pollution monitoring and control*. New Delhi: New Age International.
- Kime, D.E. (2001). *Endocrine disruption in fish*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Klaassen, C.D. (2001). *Casarett & doull's toxicology: the basic science of poisons*. International Edition, New York.
- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Güzel, S, Çelik, H. and Erel, O. (2005). Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutation Research*, **585**, 71–78.
- Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, **30**, 620-650.
- Köprücü, S., Köprücü, K., Ural, M.Ş., İspir, Ü. and Pala, M. (2006). Acute toxicity of OP pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **86**, 99–105.
- Lackner, R. (1998). Oxidative stress in fish by environmental pollutants. *Fish Ecotoxicology*, 203-224.
- Lawrence, S. G. (1981). Manual for the culture of selected freshwater invertebrates. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 169.
- Laws, E.A. (2000). *Aquatic pollution and introductory text*. (3<sup>rd</sup> ed.). John Wiley&Sons, Inc., Canada.
- Leanos-Castaneda, O., Van Der Kraak, G., Rodríguez-Canul, R. and Gold, G. (2007). Endocrine disruption mechanism of *o,p'*-DDT in mature male tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, **221**,158-167.
- Lerner, D.T., Bjornsson, B.T. and McCormick, S.D. (2007). Effects of aqueous exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on physiology and behavior



- of smolt development of Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology*, **81**, 329-336.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Li, P., Grabic, R., Velisek, J., Machova, J. and Randak, T. (2010). Biochemical and physiological responses in liver and muscle of rainbow trout after long-term exposure to propiconazole. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 1391-1396.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J. and Randak, T. (2010). Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **151**, 137–141
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L. and Wenzel, A. (2003). Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **75**, 631–681.
- Little, E.E. and Finger, S.E. (1990). Swimming behaviour as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 13–19.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V. and Storey, K.B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **37**, 1670–1680.
- Luskova, V., Svoboda, M. and Kolarova, J. (2002). The effects of diazinon on blood plasma biochemistry in carp (*Cyprinus carpio*). *Acta Veterinaria Brno*, **71**, 117-125.
- Makynen, E.A., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Tietge, J.E., Wells, K.L., Van Der Kraak, G. and Ankley, G.T. (2000). Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, **48**, 461–475.

- Manahan, S.E. (2001). *Fundamentals of environmental chemistry*. (3<sup>rd</sup> ed.). CRC Press, Florida.
- Marigoudar, S.R., Ahmed, R.N. and David, M. (2009). Cypermethrin induced respiratory and behavioural responses of the freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). *Veterinarski Arhiv*, **79**, 583-590.
- Martinovic, D., Blake, L.S., Durhan, E.J., Greene, K.J., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Makynen, E.A., Villeneuve, D.L. and Ankley, G.L. (2008). Reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow: confirming an anti-androgenic mode of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**, 478–488.
- Mason, C.F. (2001). Water pollution biology. In R.M. Harrison (Ed.), *Pollution: causes, effects and control*. (4<sup>th</sup> ed.). The Royal Society of Chemistry, UK.
- Masson, O., Fortier, P.L., Albaret, C., Froment, M.T. Bartels, C.F. and Lockridge, O. (1997). Aging of di-isopropyl-phosphorylated human butyrylcholinesterase. *Biochemical Journal*, **327**, 601-607.
- Mates, J.M., (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, **153**, 83–104.
- Maxwell, L.B. and Dutta, H.M. (2005). Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60**, 21–27.
- Mazza, J. (2002). *Manual of clinical hematology*. (3<sup>rd</sup> ed.). Lippincott Williams&Wilkins, USA.
- McCarthy, J. F. and Shugart, L.R. (1990). Biomarkers of environmental contamination. In J. F. McCarthy and L. R. Shugart (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Publishers, Chelsea, Mich. pp. 3-16.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**, 6049.

- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. and Remacle, J. (1994). Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **17**, 235–248.
- Milnes, M.R., Bermudez, D.S., Bryan, T.A., Edwards, T.M., Gunderson, M.P., Larkin, I.L.V., Moore, B.C. and Guillette, L.J. (2006). Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research*, **100**, 3–17.
- Min, E.Y. and Kang, J.C. (2008). Effect of waterborne benomyl on the hematological and antioxidant parameters of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **92**, 138-143.
- Mlambo, S.S., van Vuren, J.H.J, Barnhoorn, I.E.J. and Bornman, M.S. (2009). Histopathological changes in the reproductive system (ovaries and testes) of *Oreochromis mossambicus* following exposure to DDT. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **28**, 133-139.
- Modesto, K,A, and Martinez, C.B. (2010). Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, Article in Press, Corrected Proof.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T. and Kalinin, A.L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **143**, 141-149.
- Moraes, B.S., Loro, V.L., Pretto, A., Braga da Fonseca, M., Menezes, C., Marchesan, E., Reimche, G.B. and de Avila, L.A. (2009). Toxicological and metabolic parameters of the teleost fish (*Leporinus obtusidens*) in response to commercial herbicides containing clomazone and propanil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **95**, 57-62.
- Moretto, A. and Lotti, M. (1998). Poisoning by organophosphorus insecticides and sensory neuropathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **64**, 463-468.

- Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y. and Cheng, C.Y. (2002). Antioxidant superoxide dismutase—a review: its function, regulation in the testis, and role in male infertility. *Contraception*, **65**, 305–311.
- Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V. and Kisby, G.E. (2008). Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **227**, 97-107.
- Mushigeri, S.B. and David, M. (2005). Fenvalerate induced changes in the Ach and associated AChE activity in different tissues of fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) under lethal and sub-lethal exposure period. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **20**, 65-72.
- Natarajan, G.M. (1985). Inhibition of branchial enzymes in snake head fish (*Channa striatus*) by oxydemeton-methyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **23**, 41-46.
- Neff, J.M. (1985). Use of biochemical measurements to detect pollutant-mediated damage to fish. In R.D. Cardwel, R. Purdy and R.C. Bahner (Eds), *Aquatic toxicology and hazard assessment*. Philadelphia: American Society for Testing Materials, pp 155-181.
- Newman, M.C. and Unger, M.A. (2002). *Fundamentals of ecotoxicology*. (2<sup>nd</sup> ed.). Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nwani, C.D., Lakra, W.S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Srivastava, S.K. (2010). Mutagenic and genotoxic effects of carbofuran in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chemistry and Toxicology*, **48**, 202-208.
- Ogueji, E.O. and Auta, J. (2007). Investigations of biochemical effects of acute concentrations of lambda-cyhalothrin on african catfish *Clarias gariepinus*-Teugels. *Journal of Fisheries International*, **2**, 86-90.

- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Tagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Chemistry*, **95**, 351-358.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) (1992). Guideline for the testing of chemicals: (Part 203).
- Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W. and Schomaker, S. (2008). The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*, **245**, 20, 194-205.
- Pan, G. and Dutta, H.M. (1998). The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile largemouth bass, *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. *Environmental Research Section A*, **79**, 133–137.
- Pandey, S., Nagpure, N.S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S.K. and Verma, M.S. (2006). Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **65**, 56-61.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B. And Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river yamuna fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *The Science of The Total Environment*, **309**, 105-115.
- Parra, J.M., Sanchez-Fortun, S. and Castano, A. (2010). Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides on RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. *Environ. Toxicol.* DOI: 10.1002/tox.20637.
- Patil, M. and Kulkarni, R.S. (1993). Ovarian and hepatic biochemical response to sumaach (acrude form of HCG) in fish, *Notopterus notopterus* Pallas, under pesticide treatment. *Geobios*, **20**, 255-259.
- Paudyal, B.P. (2008). Organophosphorus poisoning. *Journal of the Nepal Medical Association*, **47**, 251-258.
- Payne, J.F., Fancy, L.L., Rahimtula, A.D. and Porter, E.L. (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in

- biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **C86**, 233–245.
- Peixoto, F., Simoes, D., Santos, D. and Fontainhas-Fernandes, A. (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **85**, 91–96.
- Philip, G. H., and Rajasree, B. H. (1996). Action of cypermethrin on tissue transamination during nitrogen metabolism in *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **34**, 174-179.
- Prasad, T. A. V. and Reddy, D. C. (1994). Atrazine toxicity on hydromineral balance of ish, *Tilapia mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **28**, 313-316.
- Prosser, C.L. (1985). *Comparative animal physiology*. (3<sup>rd</sup> ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Rahimi, R. and Abdollahi, M. (2007). A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**, 115–121.
- Ramesh, M. and Saravanan, M. (2008). Some haematological and biochemical effects of chlorpyrifos in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *International Journal of Integrative Biology*, **3**, 80-83.
- Ramesh, M., Srinivasan, R. and Saravanan, M. (2009). Effect of atrazine (Herbicide) on blood parameters of common carp *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes). *African Journal of Environmental Science and Technology*, **3**, 453-458.
- Rand, G. M. (2008). Fish toxicity studies. In R.T. Di Giulio and D. Hinton (Eds.), *The toxicology of fishes*, Taylor and Francis Publishers, Washington, D.C.
- Rao, J.V. (2006). Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide,

monocrotophos. *Chemosphere*, **65**, 1814–1820.

- Rao, J.V., Begum Ghousia, Jakka, N.M., Srikanth, K. and Nageswara Rao, R. (2006). Sublethal effects of profenofos on locomotor behavior and gill architecture of the mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Drug Chemistry and Toxicology*, **29**, 255–267.
- Rao, K.R.S.S. (1999). *Pesticide impact on fish metabolism*. Discovery Publishing House, New Delhi, India.
- Reuber, M.D. (1984). Carcinogenicity of dimethoate. *Environmental Research*, **34**, 193.
- Robinson, L. and Thorn, I. (2005). *Toxicology and ecotoxicology in chemical safety assessment*. Blackwell Publishin Ltd., UK.
- Rodrigues, E.L. and Fanta, E. (1998). Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* hamilton-buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. *Revista Brasileira de Zoologia*, **15**,441-450.
- Saha, S. and Kaviraj, A. (2003): Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *International Journal of Toxicology*, **22**, 325-328.
- Sancho, E., Ceron, J.J. and Ferrando, M.D. (2000). Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**, 81-86.
- Sancho, E., Ferrando, M. D. and Andreu, E. (1998). *In vivo* inhibition of AChE activity in the European eel *Anguilla anguilla* exposed to technical grade fenitrothion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **120**, 389-395.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., Andreau, E. and Gamon, M. (1993). Bioconcentration and excretion of diazinon by eel. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **50**, 578–585.

- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernández, C., Andreu, E. and Ferrando, M.D. (2010). Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 370-376
- Sayeed, I., Parvaez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R. and Raisuddin, S. (2003). Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 295–301.
- Sayim, F. (2007). Histopathological effects of dimethoate on testes of rats. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **78**, 479–484.
- Scott, G.R. and Sloman, K.A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrative behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, **68**, 369-392.
- Shanmugam, A. (1977). *Fundamentals of biochemistry for medical students*. College of Medical Science, Madras.
- Sharma, S., Nagpure, N. S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S.K., Singh, P.J. and Mathur, P. K. (2007). Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**, 617-623.
- Shaughnessy, D.T. and DeMarini, D.M. (2009). Types and consequences of DNA damage. In S. Knasmüller, D.M. DeMarini, I. Johnson and C. Gerhauser (Eds.), *Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors*, WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KgaA, Weinheim.
- Siang, H.Y., Yee, L.M. and Seng, C.T. (2007). Acute of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behavior and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **89**, 46-53.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **25**, 1058–1071.



- Simoniello M. F., Gigena , F., Poletta , G., Loteste , A., Kleinsorge , E., Campana , M., Scagnetti , J. and Parma, M. J. (2009). Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **83**, 155–158.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, **175**, 184–191.
- Singh, P.B. and Canario, A.V.M. (2004). Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, in response to the pesticide  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **58**, 77–83.
- Singh, P.B. and Singh, V. (2008). Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17 $\beta$  and 11-ketotestosterone, and sperm motility in *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Chemosphere*, **72**, 422–431.
- Smith, G.M., Khan, A.T., Weis, J.S. and Weis, P. (1995). Behavior and brain chemistry correlates in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) from polluted and unpolluted environments. *Marine Environmental Research*, **39**, 329–333.
- Snodgrass, W.R. (2001). Diagnoses and treatment of poisoning due to pesticides. In R.I. Krieger (Ed.), *Handbook of pesticide toxicology: principles*, Academic Press, California, USA. pp. 589-603.
- Song, S.B., Xu, Y. and Zhou, B.S. (2006). Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, **65**, 699-706.
- Soufy, H., Soliman, M., El-Manakhy E. and Gaafa, A. (2007). Some biochemical and pathological investigations on monosex Tilapia following chronic exposure to carbofuran pesticides. *Global Veterinaria*, **1**, 45-52.
- Spano, L., Tyler, C.R., van Aerle, R., Devos, P., Mandiki, S.N.M., Silvestre, F., Thoméc, J.P. and Kestemont, P. (2004). Effects of atrazine

- on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology*, **66**, 369–379.
- Spellman, F.R. (1999). *The science of environmental pollution*. (2<sup>nd</sup> ed.). Spellman Environmental Consultants, Norfolk, VA.
- Sumpter, J.P. (2005). Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **33**, 9–16.
- Suresh, A., Sivaramakrishna, B., Victoriamma, P.C. and Radhakrishnaiah, K. (1992). Comparative study on the inhibition of acetylcholinesterase activity in the freshwater fish *Cyprinus carpio* by mercury and zinc. *Biochemistry International*, **26**, 367–375.
- Svoboda, M., Luskova, V., Drastichova, J. and Ilabek, V. (2001). The effect of diazinon on haematological indices of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *Acta Veterinaria Brno*, **70**, 547-465.
- Thangavel, P., Sumathiral, K., Karthikeyan, S. and Ramaswamy, M. (2005). Endocrine response of the freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) to dimecron exposure. *Chemosphere*, **61**, 1083–1092.
- Thomas, P. (2008). The endocrine system. In R.T. Di Giulio and D.E. Hinton (Eds.), *The Toxicology of Fishes*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Tian, H., Ru, S., Bing, X. and Wang, W. (2010b). Effects of monocrotophos on the reproductive axis in the male goldfish (*Carassius auratus*): potential mechanisms underlying vitellogenin induction. *Aquatic Toxicology*, **98**, 67–73.
- Tian, H., Ru, S., Wang, W. and Bing, X. (2010a). Effects of monocrotophos on the reproductive axis in the female goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **152**, 107–113.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, Y.F. (2000). The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology

- testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206–221.
- Timbrell, J.A. (2002). *Introduction to toxicology*. (3<sup>rd</sup> ed.). Taylor and Francis, London.
- Tropp, B.E. (2008). *Molecular biology, genes to proteins*. (3<sup>rd</sup> ed.), Jones and Bartlett Publishers, Inc., USA.
- UNECE (United Nations Economic Commission for Europe) (2004). Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals (GHS). Part 3, Health and environmental hazards. Chapter 3.10, Hazardous to the aquatic environment.
- Van Der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**, 57-149.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V. and Sudova, E. (2009). Effects of acute exposure to metribuzin on some hematological, biochemical and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **82**, 492–495.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Novotny, L., Blahova, J., Sudova, E. and Maly, V. (2008). Effects of metribuzin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinarni Medicina*, **53**, 324–332.
- Ventura, B.C., Fransceschi de Angelis, D. and Marin-Morales, M.A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **90**, 42–51.
- Wagner, B.A., Buettner, G.R. and Burns, C.P. (1994). Free radical mediated peroxidation in cells: Oxidizability is a function of cell lipid *bis*-allylic hydrogen content. *Biochemistry*, **33**, 4449-4453.
- Walsh, L.P., Webster, D.R. and Stocco, D.M. (2000). Dimethoate inhibits steroidogenesis by disrupting transcription of the steroidogenic acute regulatory (*StAR*) gene. *Journal of Endocrinology*, **167**, 253–263.

- Wang, C., Lua, G., Cuib, J. and Wang, P. (2009). Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **28**, 414–419.
- Wedemeyer, G.A. and Yasutake, W.T. (1977). Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress of fish health. US Fish and Wildlife Service Technical Paper 89.
- Wedemeyer, G.A., Mcleay, D.J. and Goodyear, C.P. (1976). Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. In V.W. Cairns, P.V. Hodson and J.O. Nriagu (Eds.), *Contaminant Effects on Fisheries*. John Wiley & Sons, New York.
- Wendelaar Bonga, S.E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**, 591–625.
- Whitehead, A., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Kotelevtsev, S. and Anderson, S.L. (2004). Genotoxicity in native fish associated with agricultural runoff events. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 2868–2877.
- Wild, D. (1975). Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research*, **32**, 133-150.
- Wilhelm Filho, D., Giulivi, C. and Boveris, A. (1993). Antioxidant defences in marine fish. I. Teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **106**, 409 - 413.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. and Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, **94**, 114-122.
- Yaduvanshi, S.K., Ojha, A., Pant, S.C., Lomash, V. and Srivastava, N. (2010). Monocrotophos induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **97**, 214-222.
- Yang, Z.P., Morrow, J., Wu, A., Roberts, L.J. and Dettbarn, W.D. (1996). Diisopropylphospho-uridate-induced muscle hyperactivity associated with enhanced lipid peroxidation in vivo. *Biochemical Pharmacology*,

- Yi, X. H., Liu, H. H., Lu, Y. T., Tao, J., Ding, H., Zhang, M. and Jiang, W. (2007). Altered serum levels of sex steroids and biotransformation enzyme activities by long-term alachlor exposure in crucian carp (*Carassius auratus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **79**, 283-287.
- Zhang, M. and Yin, D. (2008). The changes of serum testosterone level and hepatic microsome enzyme activity of crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to a sublethal dosage of pentachlorophenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 384-389.
- Zhang, Z. and Hu, J. (2008). Effects of *p,p'*-DDE exposure on gonadal development and gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Environmental Sciences*, **20**, 347-352.

## ÖZGEÇMİŞ

**Eğitim**      **Lisans:** Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Adana  
(1997-2001)

**Yüksek Lisans:** Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Biyoloji Anabilim Dalı (2001-2004)

- Projeler**
- Diazinonun *Cyprinus carpio* Dokularında Oksidatif Stres ve Nörotoksisite Potansiyeli (FEF2003YL6)
  - Dimethoate Etkisinde *Oncorhynchus mykiss* Dokularında Oksidatif Stres ve DNA Hasarının Araştırılması (FEF.09.08)

**Yayımlar**      **I- SCI Kapsamlı Dergilerde Yayımlanmış Olan Makaleler**

- Oruç, E.O., Uner, N., Sevgiler, Y., Usta, D. and Durmaz, H. (2006). Sublethal effects of organophosphate diazinon on the brain of *Cyprinus carpio*. *Drug and Chemical Toxicology*, **29**, 57-67.
- Uner, N., Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Sahin, N., Durmaz, H. and Usta, D. (2006). Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **21**, 241 – 245.
- Oruc, E.O. and Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **23**, 48 – 55.
- Dogan, D. and Can, C. (2011). Endocrine disruption and altered biochemical indices in male *Oncorhynchus mykiss* in response to dimethoate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **99**, 157-161.

## II- Ulusal ve Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler

- Oruç, E. O. and Usta, D. (2003). Biochemical effects of diazinon on antioxidant defence system, lipid peroxidation and acetylcholinesterase activity in digestive glands of *Cyprinus carpio* L. Turkish Journal of Biochemistry 13th Balkan Biochemical Biophysical Days & Meeting on Metabolic Disorders' Programme & Abstracts. Page 164.
- Dogan, D. and Can, C. (2010). *Oncorhynchus mykiss* beyin dokusunda dimethoate tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunun asetilkolinesteraz inhibisyonuna etkisi. Çevre ve Toksikoloji Sempozyumu. Mersin, Sf. 11.