

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Deniz ÖZTÜRK

***Cyprinus carpio*'da MALATHİON ETKİSİNDE LİPİT PEROKSİDASYONU
ve SERUM STEROİD HORMON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2009

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Cyprinus carpio*'da MALATHİON ETKİSİNDE LİPİT PEROKSİDASYONU
ve SERUM STEROİD HORMON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

**Deniz ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu Tez 07 / 01 / 2009 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği /
Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.**

İmza	İmza	İmza.....
Doç.Dr. Elif ORUÇ	Prof.Dr. Mustafa CANLI	Yard.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN
Danışman	Üye	Üye

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod no:

**Prof.Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür**

**Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
desteklenmiştir.**

Proje No: FEF2007YL41

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Cyprinus carpio*'da MALATHİON ETKİSİNDE LİPİT PEROKSİDASYONU
ve SERUM STEROİD HORMON DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİMLER**

Deniz ÖZTÜRK

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Doç.Dr. Elif ORUÇ

Yıl : 2009, SAYFA: 54

Jüri : Doç.Dr. Elif ORUÇ

Prof.Dr. Mustafa CANLI

Yard.Doç.Dr. Ramazan BİLGİN

Bu çalışmada, organofosfatlı insektisit malathionun *Cyprinus carpio*'da kortizol, estradiol ve testosteron salınımları, lipit peroksidasyonu ve glutatyon miktarlarına etkileri incelenmiştir. 1, 15, 30 gün süre ile 0.01 ppm, 0.05 ppm ve 0.1 ppm subletal malathion derişimlerinin etkisinde ve 15 gün pestisit bulunmayan ortamda bekletildikten sonra balıkların beyin dokularında nörotoksisite göstergesi olarak asetilkolinesteraz spesifik aktivitesi, oksidatif stresi belirlemek üzere glutatyon ve malondialdehit miktarları spektrofotometrik yöntemlerle, endokrin bozucu etkisini belirlemek üzere serumda kortizol, estradiol ve testosteron miktarları elektrokemilüminesans yöntemle belirlenmiştir.

Asetilkolinesteraz aktivitesi denenen tüm deneme sürelerinde derişime bağı olarak azalmıştır. Glutatyon miktarı düşük malathion derişimlerinde artarken malathionun yüksek derişimlerinin etkisinde azalmıştır. Malondialdehit ve estradiol miktarlarında dalgalanmalar meydana gelirken 15 gün pestisit bulunmayan ortamda bekletildikten sonra malondialdehit ve estradiol miktarları artmıştır. Kortizol miktarı ilk gün denenen tüm derişimlerde artmış, 15. ve 30. günlerde yüksek derişim etkisinde azalmıştır. Malathionun denenen derişimleri testosteron miktarları etkilemezken 15 gün pestisit bulunmayan ortamda bekletildikten sonra testosteron miktarı azalmıştır.

Malathion etkisinde *C. carpio*'da hormon düzeylerinde bulunan azalmanın oksidatif stres kaynaklı olabileceğı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Pestisit, balık, oksidatif stres, lipit peroksidasyonu, endokrin bozunma

ABSTRACT

MSc THESIS

LIPID PEROXIDATION and the ALTERATIONS of PLASMA STEROID HORMONE LEVELS AFTER MALATHION EXPOSURE to *Cyprinus carpio*

Deniz ÖZTÜRK

UNIVERSITY of ÇUKUROVA
INSTITUTE of NATURAL and APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT of BIOLOGY

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elif ORUÇ

Year: 2009, **Page:**54

Jury: Assoc.Prof.Dr. Elif ORUÇ

Prof.Dr. Mustafa CANLI

Asist.Prof.Dr. Ramazan BİLGİN

In this study, the effects of malathion, organophosphate insecticide, on cortisol, estradiol and testosterone secretions, lipid peroxidation and glutathione levels were investigated in *Cyprinus carpio*. Fish were exposed to 0.01 ppm, 0.05 ppm and 0.1 ppm sublethal concentrations of malathion for 1, 15, 30 days and then recovery periods for 15 days were allowed. Acetylcholinesterase specific activity was evaluated as a biomarker of neurotoxicity, glutathione and malondialdehyde levels were evaluated to determine oxidative stress by using spectrophotometric methods. Cortisol, estradiol and testosterone levels were measured to determine the endocrine disruption effects of malathion by using electrochemiluminescence method.

The activity of acetylcholinesterase decreased dose dependently at all exposure periods. Glutathione levels increased at the effects of low malathion concentrations while it decreased following exposure to high concentrations of malathion. Fluctuations were observed at malondialdehyde and estradiol levels, but, they increased after 15 days depuration period. Cortisol levels increased after all exposure concentrations for first day and decreased at 0.05 ppm and 0.1 ppm malathion concentrations for 15 and 30 days. Malathion didn't affect the testosterone levels in the serum of *C. carpio* but, testosterone levels decreased after 15 days depuration period.

This is the first study to evaluate both oxidative stress and bioindicators of reproduction in *C. carpio* exposed to malathion. It could be concluded that malathion has an oxidative stress-mediated endocrine disruption effect.

Keywords: Pesticide, fish, oxidative stress, lipid peroxidation, endocrine disruption

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bana destek olan danışmanım Doç.Dr. Elif Oruç'a, maddi ve manevi desteklerini gördüğüm aileme ve değerli yardımları nedeniyle Biyolog Pelin Ören ve Biyolog Aşkın Barış Kaya'ya sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller.....	4
1.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	5
1.2.1. Süperoksit (O_2^-) Radikali ve Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	6
1.2.2. Hidroksil ($HO^\cdot$) Radikali, Haber-Weiss Reaksiyonu.....	6
1.2.3. Singlet Oksijen (1O_2).....	6
1.3. Oksidatif Stres ve Lipit Peroksidasyonu.....	7
1.4. Antioksidant Savunma Mekanizmaları.....	8
1.5. Balıklarda Endokrin Sistem.....	10
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	13
3. MATERYAL ve METOD.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	17
3.1.3. Deney Materyali.....	18
3.2. Metod.....	18
3.2.1. Nörotoksisitenin Belirlenmesi	19
3.2.2. Oksidatif Stresin Belirlenmesi.....	20
3.2.2.1. Malondialdehit Yöntemi.....	20
3.2.2.2 Glutasyon Yöntemi.....	22
3.2.3. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	23
3.2.4. Steroid Hormon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	25

3.2.5. İstatiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	27
4.1. Beyin Dokusu	27
4.1.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkisi	27
4.1.2. Malondialdehit Miktarına Etkisi	28
4.1.3. Glutasyon Miktarına Etkisi.....	30
4.2.4. Protein Miktarına Etkisi.....	31
4.2. Kan Dokusu	33
4.2.1. Serum Kortizol Miktarına Etkisi	33
4.2.2. Serum Estradiol Miktarına Etkisi	34
4.2.3. Serum Testosteron Miktarına Etkisi	36
5. TARTIŞMA.....	38
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi.....	20
Çizelge 3.2. Malondialdehit Standart Eğri Çalışması.....	21
Çizelge 3.3. Malondialdehit Yöntemi.....	22
Çizelge 3.4. Glutatyon Yöntemi.....	23
Çizelge 3.5. Protein Standart Eğri Çalışması.....	24
Çizelge 3.6. Protein Yöntemi.....	25
Çizelge 4.1. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda AChE (U/ mg protein) aktivitesindeki değişimler.....	27
Çizelge 4.2. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda MDA (nmol/ mg protein) miktarındaki değişimler.....	29
Çizelge 4.3. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda GSH (U/ mg protein) miktarındaki değişimler.....	30
Çizelge 4.4. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda protein (mg/mL) miktarındaki değişimler.....	32
Çizelge 4.5. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum kortizol (ug/dL) miktarındaki değişimler.....	33
Çizelge 4.6. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum estradiol (pg/mL) miktarındaki değişimler.....	35
Çizelge 4.7. <i>C. carpio</i> 'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum testosteron (ng/mL) miktarındaki değişimler.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 1.1. Malathion biotransformasyonu.....	4
Şekil 1.2. Glutasyon yapısı	9
Şekil 1.3. Balıklarda vitelojenez.....	12
Şekil 4.1. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda AChE (U/ mg protein) aktivitesinin kontrole göre % değişimi.....	28
Şekil 4.2. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda MDA (nmol/ mg protein) miktarının kontrole göre % değişimi.....	29
Şekil 4.3. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda GSH (U/ mg protein) miktarının kontrole göre % değişimi.....	31
Şekil 4.4. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda protein (mg/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.....	32
Şekil 4.5. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum kortizol (ug/dL) miktarının kontrole göre % değişimi.....	34
Şekil 4.6. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum estradiol (pg/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.....	35
Şekil 4.7. <i>C. carpio</i> 'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum testosteron (ng/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.....	37

SİMGELER VE KISALTMALAR

Asetilkolinesteraz : AChE

Asetilkolin : ACh

Glutatyon : GSH

Glutatyon Peroksidaz : GPx

Glutatyon S-transferaz: GST

Hidroksil : HO[·]

Hidrojen atomu : H⁺

Hidrojen peroksit : H₂O₂

Malondialdehit : MDA

Moleküler oksijen : O₂

Süperoksit Radikali : O₂^{·-}

1.GİRİŞ

Pestisitler, insan ve hayvan vücudu ile bitkiler üzerinde veya çevresinde yaşayan, besin kaynaklarının üretim, depolanma ve tüketimi sırasında besin değerlerini azaltan ya da zarara uğratan böcek, kemirici, yabani ot, mantar gibi canlı formlarının yıkıcı etkilerini azaltmak için kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu amaçla, dünyada onlarca değişik kimyasal formülasyona sahip madde, her yıl yaklaşık 1,5 milyon ton kadar üretilmekte ve yüksek ticari hacim oluşturmaktadır (Meister, 1999, Mckenzie, 2001). Bununla beraber, hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkilerinden dolayı ekosistemde ciddi zararlı etkilere neden olmaktadır.

Canlıların nörolojik ve davranışsal hareketleri çevre kirliliğine karşı çok duyarlıdır (Bretaud ve ark., 2000). Pestisitlerin balıklara etkileri farklı şekillerde görülür. Balık popülasyonlarında letaliteye neden olmakla birlikte yumurta koyma ve üremeyi durdurarak etkili olabilmektedirler. Ayrıca dokularda meydana getirdikleri hasarlar ile balıklarda duyarlılığa yol açarak balıkların mevsimlik ısı değişimlerinden ve geçici açlıktan gereğinden fazla etkilenmesine neden olurlar (Toros ve Maden, 1991).

Pestisitler; etki ettikleri canlı grubuna göre insektisitler, fungusitler, herbisitler, mollusitler, rodentisitler, akarisitler, nematositler olarak, kimyasal tiplerine göre organofosfatlar, karbamatlar, organoklorlular, sentetik piretroidler, fenoller, morfolinler, organometalikler, kloroalkiltiyoller, azoller, anilinler, kloronitriller, üreler, bipyridium bileşenler olarak sınıflandırılabilirler (Mars, Ballantyne).

Organofosfatların akuatik faunayı etkileyebilecek derişimleri su ortamına ulaşmada dirençlilik gösterir. Organofosfatlar omurgalı ve omurgasız canlılara düşük derişimlerde (ng-µg/mL) bile aynı derecede toksiktirler, özellikle balıklarda toksisiteye neden olurlar (Hai ve ark., 1997).

Organofosfatların temel etkisi omurgalı ve omurgasız organizmalarda sinir impulslarında iletimi sonlandırmaktan sorumlu asetilkolinesteraz (AChE) enziminin inhibisyonu yoluyla toksik etki gösterirler. Organofosfatlar merkezi, periferel, nöronal sinapslardaki nörotransmitter asetilkolinin (ACh) hidrolizini bloke ederek

ACh'nin aşırı birikimine ve ACh reseptörlerinin aktivasyonuna neden olur (Peña-Llopis, 2003). Asetilkolin vücutta en yaygın bulunan nörotransmitterlerden biridir. Merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinden, somatik sinir sisteminin motor nöronlarından, otonomik sinir sisteminde pre-post ganglionik parasempatik nöronlar ile preganglionik sempatik nöronlardan salınmaktadır (Ganong, 2003). Nöronal sinapslardan salınan ACh eritrositlerde, sinir uçlarında, kaslarda, akciğerde, dalakta ve beyin tüm bölümlerinde bulunan gerçek, spesifik AChE enzimi tarafından fizyolojik koşullarda hidrolize uğrar (Çokuğraş, 2003, Patocka.2004). Organofosfatlar da ACh gibi AChE molekülünün aktif bölgesinde bulunan serin amino asidine bağlanırlar ve fosforillenmiş aktif yeri olan bileşik oluşur. Organofosfat ve AChE arasındaki reaksiyonda, önce geri dönüşümlü enzim-inhibitör kompleksi oluşur. Kompleks oluşum hızı, organofosfat bileşiğinin yapısına, büyüklüğüne, R₁ ve R₂ gibi alkil grupların yapısına bağlıdır (Bajgar, 2004). Başlangıçtaki bağlanma aşamasından bir süre sonra kovalent fosfor-enzim bağı aşırı stabil hale gelir ve böylece enzim molekülünün fosforilasyonu ve inaktivasyonu oluşur. Burada, organofosfatlı bileşikteki bir alkil grubu kopar, enzimdeki serin aminoasidinin hidroksil grubu hidrojenini kaybederek fosfor atomuna bağlanır ve fosforillenme oluşur. İnaktif hale gelen AChE enzimi sinaptik aralıkta ACh molekülünü parçalayamaz. Bu durumda fizyolojik miktarda üretilen ve sinaptik aralığa salınan ACh'nin postsinaptik bölgede yıkılamayarak birikimi, kolinerjik uyarıların sürekli gerçekleşmesine ve dolayısıyla uç-efektör organların aşırı aktivite göstermesine neden olur (Treatment of Chemical Agent Casualties and Conventional Military Chemical Injuries, 1995, Textbook of Military Medicine, 1997).

Enzim ile kompleks yapan sinir ajanının bir süre sonra oksijen-fosfor bağlarından biri daha kırılır ve bileşik ikinci alkil grubunu kaybeder. Bu durum fosfor-enzim bağının daha da güçlenmesine neden olur. Bu basamak zamana bağımlı bir reaksiyon olup, enzim ile organofosfatlar birbirlerinden ayıramayacak ve enzim reaktif edilemeyecek şekilde modifikasyona uğramaktadır. Bu basamakta gerçekleşen reaksiyona “aging” (eskime) adı verilmektedir (Bajgar, 1992, Vale, 1998).

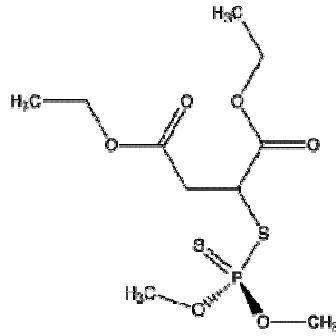
Malathion, balıklarda yüksek derecede toksisiteye sahip organofosforlu bir insektisittir. Yarı ömrünün çok kısa olması sebebiyle akuatik organizmalarda birikim fazla görülmemektedir (extoxnet.orst.edu). Petrol yağlarında sınırlı olarak çözülmekle beraber bir çok organik çözücüde çözünebilir. Ayrıca, sivrisineklerin, sineklerin, ev haşerelerinin, hayvan dış parazitlerinin ve insan bitinin kontrolünde kullanılmaktadır.

Malathion toksisitesi, malathionun hidrolitik degregasyonunu katalizleyen veya malaoxon inhibisyonu için rekabetçi hedef olarak davranan spesifik olmayan serin karboksilesteraz tarafından ve salgı konjugantlarının oluşumlarını katalizleyen glutasyon S-transferaz (GST) tarafından indirgenebilir (Pathiratne ve George, 1998). Malathion anti-kolinesteraz malaoxonu aktive etmek için mono-oksojenaz tarafından aktive edilmektedir. Malathion ve malaoxon karboksilesteraz tarafından detoksifiye edilir (Caldwell, 1983, Şekil 1.1.).

Kimyasal Adı: S-1,2-di(ethoxycarbonyl) ethyl 0,0-dimethyl phosphorodithioate

Kimyasal Formül: $C_{10}H_{19}O_6PS_2$

Kimyasal Yapı:



Moleküler Ağırlık: 330.36

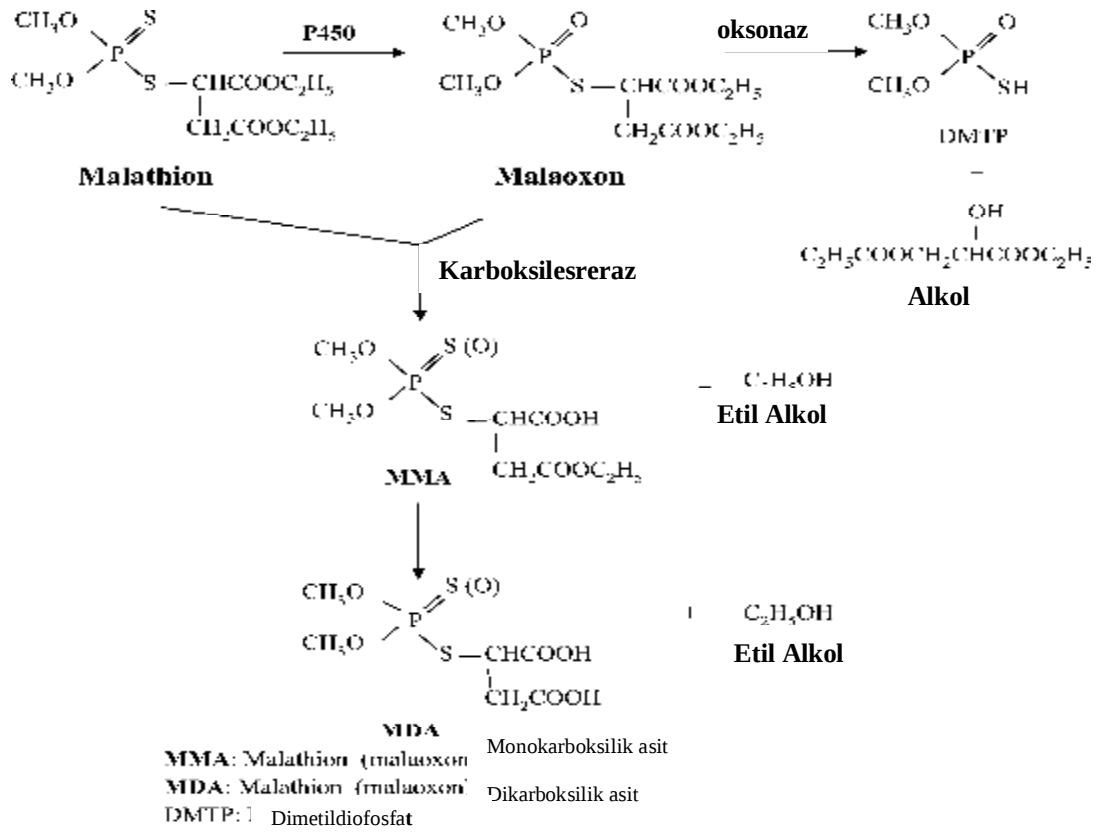
Özgül Ağırlık: 1.23

Kaynama Noktası: 156 °C

Erime Noktası: 2.85 °C

Buhar Basıncı: 20 °C'de 5.5×10^{-6} mmHg

Suda Çözünürlük: 130 mg/L



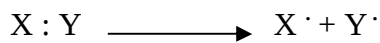
Şekil 1.1. Malathion biotransformasyonu (Buratti ve Testai, 2005)

1.1. Serbest Radikaller

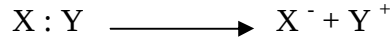
Serbest radikaller pestisitlerin toksisitesinde önemli rol oynamaktadırlar. Pestisitler oksidatif stresi indükleyebilir, serbest radikallerin üretilmesine ve antioksidan enzim sistemi veya serbest oksijen radikal yakalayıcıları içeren enzim sisteminin değişimine neden olabilir (Banerjee ve ark., 1999).

Bir serbest radikal üç yolla ortaya çıkabilir (Halliwell ve Gutteridge, 2001):

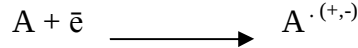
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. Homolitik bölünmede her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır.



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



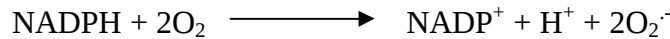
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



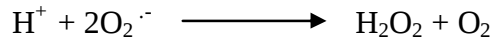
Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (Akkuş, 1995).

1.2. Reaktif Oksijen Türleri

Aerobik organizmaların normal oksijeni kullanmaları sonucunda çeşitli reaktif oksijen türler üretilir ve oluşan hidroksil ($HO^{\cdot}$), süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) gibi reaktif oksijen türleri biyolojik makromoleküllerle reaksiyona girerek enzim inaktivasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı yoluyla oksidatif stres indüklenebilir. Reaktif oksijen türlerin zararlı etkilerinin yanında yararlı etkilerinin de olduğunun düşünülmesine yol açan olay fagositozudur. Fagositozun başlangıcunda makrofajların oksijen alımları 10-20 katı artmakta ve mitokondrial solunumda kullanılmayan fazla miktardaki oksijen solunum patlamasına yol açmaktadır. Aynı zamanda pentoz fosfat aktivitesinin artışına bağlı olarak hücreye alınan glukoz miktarı da artmaktadır. Bu şekilde ortamdaki oksijeni alan nötrofiller anaerob bakterilerin ölmesine neden olmaktadır. Ayrıca nörofiller yapılarındaki NADPH oksidaz ile oksijenden süperoksit radikali oluşturmaktadır.



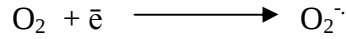
Bazı bakteriler için öldürücü olabilen süperoksit radikali fagositik vakuolde süperoksit radikalinden hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturabilmektedir.



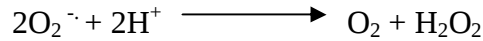
Asidik pH oluşmasına bağlı olarak hidrolitik enzim aktiviteleri artmakta ve membranı kolayca geçen H_2O_2 bakteriye toksik etki yapmakta veya $HO^{\cdot}$ radikaline dönüşmektedir (Sözmen, 2002).

1.2.1. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) Radikali ve Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle kararsız bir yapı olan süperoksit radikali oluşur.

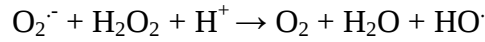


$O_2^{\cdot-}$ 'un doğrudan indirgenmesiyle veya süperoksit anyonuna bir elektron eklenmesiyle (süperoksit dismutasyonu) hidrojen peroksit oluşur (Desideri ve Falconi, 2003).



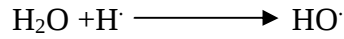
1.2.2. Hidroksil ($HO^{\cdot}$) Radikali, Haber-Weiss Reaksiyonu

Haber-Weiss reaksiyonu: Hidrojen peroksit, $O_2^{\cdot-}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikalini oluşturur (Liochev ve Fridovich 2002).



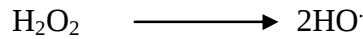
Suyun yüksek enerjili iyonize radyasyon etkisinde kalmasıyla da $HO^{\cdot}$ oluşur.

x veya γ
ışınları



H_2O_2 'nin UV ışığı etkisinde kalması ile $HO^{\cdot}$ oluşabilir.

UV



1.2.3. Singlet Oksijen (1O_2)

Yapısında eşleşmemiş elektronu bulunmaması nedeniyle serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türlerin gurubunda yer alır. Elektronca zengin moleküller ile reaksiyona girer. 1O_2 serbest radikal reaksiyonların başlamasına neden olması açısından önem taşımaktadır.

1.3. Oksidatif Stres ve Lipit Peroksidasyonu

Oksidatif stres, pro-oksidan ajanlar ve antioksidantlar arasındaki dengenin pro-oksidan lehine kayması olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stres başlıca 3 faktör nedeniyle meydana gelmektedir.

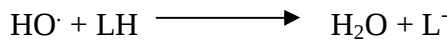
1. Reaktif oksijen üretiminde artma,
2. Antioksidant savunma sisteminde bozulma,
3. Oksidatif zararı onarmadaki yetersizlik.

Reaktif oksijen türlerinin başlıca zararları membran lipitleri (lipit peroksidasyon), DNA ve protein gibi hücrel makromoleküllerin değişmesiyle sonuçlanır (Dorval ve Hontela, 2003).

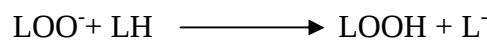
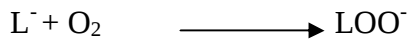
Lipit peroksidasyonu hidroksi radikallerinin hücre membranındaki yağ asitleriyle reaksiyonu sonucu lipit peroksidasyonu oluşur (Allen ve Venkatraj, 1992). Lipit peroksidasyonu hücre membranının fonksiyonları ve yapısal organizasyonunda önemli değişikliklere neden olur (Borochoy ve ark., 1979).

Reaktif oksijen türleri hücre hasarı meydana getirirken lipitlerden farklı radikaller ve lipit peroksitler de oluşmaktadır. Lipit peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonun başlatılması için tetikleyici faktör gereklidir. Bu faktörün HO[•] radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipit peroksidasyonu, poliansatüre yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur (Pinchuk ve ark., 1998, Mamett 1999, Nyska ve Kohen 2002). Bunlar;

Başlatma safhası: Hem membran lipitleri hem de besinsel yağlar için geçerli olan reaksiyonda HO[•] radikali, bir yağ asitinin (LH) metilen molekülünden bir hidrojen atomu (H⁺) kopararak bir lipit radikali (L[•]) oluşturur.

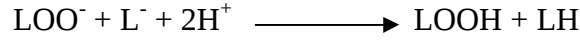


İlerleme ve yıkım safhası: Zincirleme reaksiyona uğrayan lipit radikaline O₂ eklenir ve lipit peroksil radikali (LOO[•]) ile lipit peroksit oluşur.



Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipitin parçalanması ile sonuçlanır. Lipit peroksidasyon ürünlerinden biri de malondialdehittir (MDA). Açığa çıkan diğer ürünler ise, 4-hidroksinonenal ve 4-hidroksi-2,3-transnonenaldır.

Sonlanma safhası: Antioksidantlar ile zincir reaksiyonu son bulur ve stabil son ürün oluşur.



1.4. Antioksidant Savunma Mekanizmaları

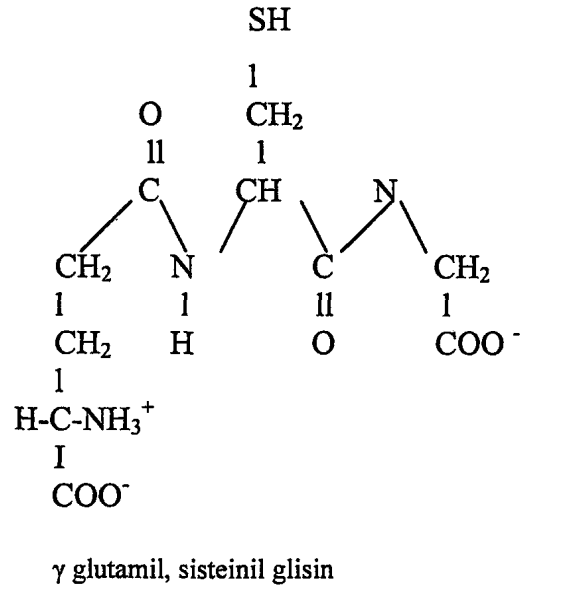
Antioksidant savunma mekanizmaları canlılarda normal metabolik işleyiş sırasında sürekli oluşan serbest radikalleri yok eden veya zararlı etkilerini azaltan sistemlerdir.

Hücrel oksidant savunmalar askorbik asit, vitamin E ve tiyoller gibi antioksidant bileşikler ile katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidant enzimler olarak sınıflandırılmaktadır (Chiou ve Tzeng, 2000).

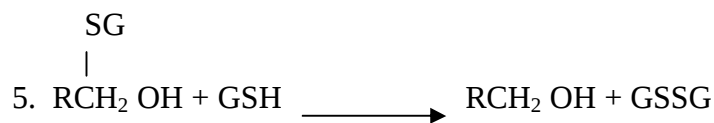
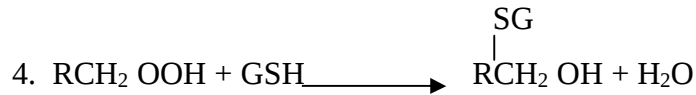
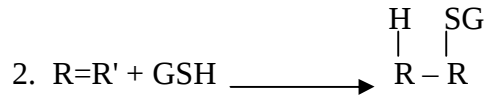
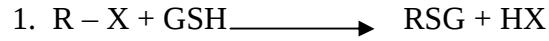
Bir tripeptid olan GSH γ -glutamil, sisteinil ve glisinden (Şekil 1.2.) oluşmaktadır. H_2O_2 ve organik peroksitlerin GPx etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, GSH serbest sülfidril grubu aracılığıyla H_2O_2 , $\text{O}_2^\cdot$, $\text{HO}^\cdot$ ve alkoksil radikalleri ($\text{RO}^\cdot$) ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedir (Meister ve Anderson, 1983, Sies, 1999). Ayrıca doku için GSH derişiminin düştüğü durumlarda glikolitik enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin ve doku ATP içeriğinin azaldığı gösterilmiş ve GSH'ın hücrel enerji durumunu etkileyebileceği ileri sürülmüştür (Pullar ve ark., 1999).

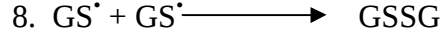
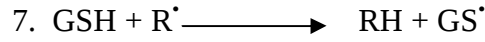
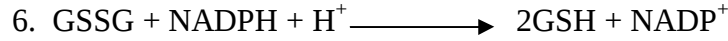
Glutatyon peroksidaz enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla GSH H_2O_2 veya lipit peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol alırken kendisi başka bir glutatyon molekülüyle disülfid köprüsü oluşturarak okside glutatyon (GSSG) formuna dönüşür. Hücre içerisinde serbest radikallerin detoksifikasyonunun sürdürülmesi için okside glutatyonun redükte formuna geri dönüştürülmesi gerekir. NADPH'nın kullanıldığı bir reaksiyonla okside glutatyon

glutasyon redüktaz enzimi ile tekrar redükte glutasyon formuna çevrilir (Akkuş, 1995, Sözmen, 2002).



Şekil 1.2. Glutasyon yapısı (Kang, 1997)





Birden beşe kadar olan reaksiyonlar önemli bir enzim ailesi olan GST tarafından katalizlenmektedir. Halojen veya nitro grupları (-X) GS'nin yerini alan elektrofilik atoma bağlanır (reaksiyon 1). Eğer bir atom elektrofilik ise GSH çift bağa katılabilir (reaksiyon 2). Epoksit köprüsü açılabilir (reaksiyon 3). Peroksi grubu iki basamakta redüklenabilir (reaksiyon 4 ve 5). Serbest radikaller iki basamakta elimine edilebilir (reaksiyon 7 ve 8). Reaksiyon 4 ve 5 GPx, reaksiyon 6 glutatyon redüktaz tarafından katalizlenir.

Redükte glutatyon (GSH) ölçümü oksidatif stresin ve antioksidant savunma sisteminin durumu hakkında bize önemli bilgiler sağlar (Beutler ve ark.,1963).

1.5. Balıklarda Endokrin Sistem

Organik kirletici bileşenlerinin akuatik çevrede östrojenik etki göstermesi yaygındır. Bu tür bileşenler ksenoöstrojenler, östrojenik etki edenler, hormon gibi davrananlar ve endokrin bozucu kimyasallar olarak tanımlanırlar. Bu bileşenlerin gerçek potansiyelleri 17β-estradiol gibi endojen hormonlar ile az benzerdir fakat çevresel derişimleri zararlı biyolojik etki yapabilmeleri için yeterince yüksektir (Ratchell ve Ostrander, 2003).

Normal endokrin fonksiyonlarını bozan bileşikler reproduktif fonksiyonların regülasyonundan sorumlu hormonal yolları bozma yeteneğindedir. Balıkların reproduktif endokrinolojisi hipotalamik-hipofiz-gonadal eksenini düzenleyen bir dizi kimyasal reaksiyon içerir. Bu eksen bir feedback sistem tarafından kontrol edilir ve östrojen gibi hormonların feedback sistemine hassastır. Mevsimsel veya lokal işaretler sonucunda beyinde oluşan sinyaller hormon sekresyonundaki değişimler olarak hipotalamik-hipofiz sistem tarafından düzenlenir Hipotalamustan salınan hormonlar (gonadotropin salan hormon; GnRH, kortikotropin salan hormon; CRH, tiotropin salan hormon; TRH) hipofiz bezindeki salgı hücrelerinden hormonların salınmasına neden olur. Hipofiz bezinin bir kısmı olan pars distalisten gonadotropin

(GtH), adrenokortikotropin (ACTH) ve tiotropin (TSH) salınır. Bunlar kendi hormonlarının salgılanmasını stimüle etmek için gonad, adrenal ve tiroid bezlerine etki eden peptid hormonlardır. GtH-I vitelojenez veya spermatojenezde etkinden GtH-II indüklenen steroid olgunlaşmasının sentezini stimüle edebildiği sırada son gamet olgunlaşmasında etkindir. Gonadotropinin ana rolü gonadları ve gonadların steroid salgılamasını stimüle etmektir. Bunlar sırasıyla eğer varsa ikinci seksüel karakterlerde, davranışlarda, kur yapma hareketlerinde, gamet oluşumunda, gamet olgunlaşmasında ve en sonunda yumurtlamada değişiklikler başlatır. Östrojen, hipotalamus, hipofiz ve gonadlar üzerinde hem pozitif hem negatif etki yapabilir (Maxwell ve Dutta, 2005).

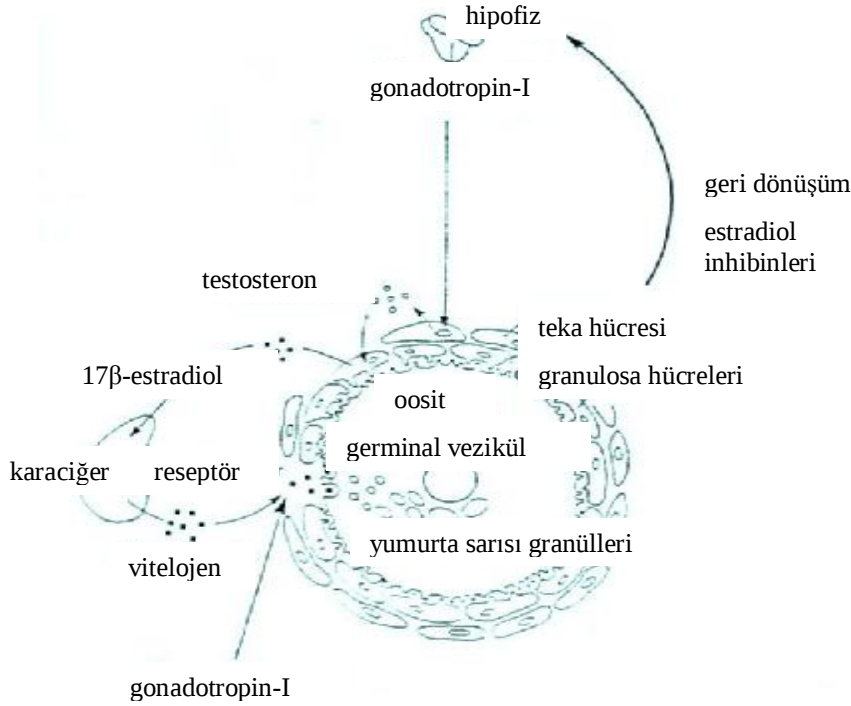
Endokrin bozucuların ters etki göstermeleri birkaç yolla olabilir:

1. Östrojen reseptörüne bağlanarak bloke edebilir veya hormon gibi davranabilirler,
2. Hormonu taşıyıcı proteinden ayırabilir ve proteini hedef hücreler için kullanılamaz hale getirebilirler,
3. Hormon sentezini etkileyebilirler,
4. Hücre membranı üzerindeki androjen reseptörler gibi diğer hormon reseptörlerini etkileyebilirler (Ratchell ve Ostrander, 2003).

Bir kortikosteroid hormon olan kortizol, metabolizma ve immun fonksiyonlar üzerindeki etkileri nedeniyle tüm omurgalılarda homeostazisin önemli fizyolojik efektörüdür. Balıklarda kortizolün antigonadal etkisi vardır ve osmoregülasyonda önemli bir rol oynamaktadır (Bisson ve Hontela, 2002).

Vitelojen ovipar omurgalılarda yumurta sarısının üretiminde kompleks öncü proteindir (Ischibashi ve ark., 2005). Balıklarda vitelojen, yumurtalık östrojenlerin stimülasyonundan sonra karaciğerde sentezlenir (Yamaguchi ve ark., 2005), kan dolaşımı ile yumurtalığa geçer ve oositlerle birleşir (Şekil 1.3.). Vitelojen normal olarak olgun dişilerin kanında bulunmaktadır, erkek ve ergin olmayan balıklarda ise düşüktür. Hepatik vitelojen sentezinin doğal başlatıcısı 17β -estradioldür (Ischibashi ve ark., 2005). 17β -estradiol spesifik östrojen reseptörüne bağlanarak östrojene uyumlu genleri regüle eder. Daha sonra östrojen-östrojen reseptör kompleksi hedef

öncü genlerin östrojene uyumlu elementleriyle transkripsiyonel aktivitelerini module etmek için etkileşime girmektedir (Yamaguchi ve ark., 2005).



Şekil 1.3. Balıklarda vitelojenez (Kime, 2001).

Balıklardaki temel cinsiyet steroidleri estradiol ve testesterondur. Olgunlaşmamış dişi balıklarda cinsiyet steroid düzeyleri düşüktür, fakat seksüel olgunlaşmada bu düzeyler yükselir ve ortaya çıkan ana sirkülasyon sex steroid hormonu estradioldur, estradiolu testosteron takip eder. Dişi balıklardaki ana hormon estradiol gelişmiş oosit folikülünde üretilir. Bu folikül gonadotropin etkisindeki testosteronu üreten dış kapsül tabakası ve testosteronu estradiole dönüştüren oosite bitişik iç granulosa tabakası olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Estradiol vitelogeni üretmek için karaciğeri stimule etmektedir (Kime, 2001).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yoğun ve bilinçsiz pestisit kullanımının hedef dışı organizmalara olan zararlı etkilerini belirlemek üzere dünyada pek çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Malathionun Çukurova bölgesinde 2007 yılında kiraz sineğine (*Rhagoletis cerasi* L.) karşı 708.5 kg, Akdeniz meyve sineğine (*Ceratitis capitata*) karşı 5 kg kullanıldığı bilinmektedir (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2007).

Tilapia mossambica'da 2 ppm malathion etkisinde beyin, kas, solungaç ve karaciğer dokusunda AChE aktivitesinde 60 saat sürede önemli derecede azalma meydana gelmiştir. Maksimum inhibisyon 36. ve 48. saatlerde olmuştur. İnhibisyon en fazla beyin, en az karaciğer dokusunda olmuştur (Sahib ve ark., 1980).

Clarias batrachus'da 40 gün süre ile 0.5 ppm malathion etkisinde kanda serbest amino asit ve glukoz miktarının arttığı, glikojen miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Mukhopadhyay ve Dehadrai, 1980).

Heteropneustes fossilis'te malathionun 24, 48, 72 ve 96 saat LC₅₀ değerleri sırası ile 9.50, 9.25, 8.62, 8.50 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada 2, 6, 12, 48 ve 96 saat süre ile 7.60 ppm malathion etkisinde kas ve karaciğer dokusunda glikojen miktarının azaldığı, hematokrit değerinin ve hemoglobin miktarının önemli derecede azaldığı bulunmuştur (Mishra ve Srivastava, 1983).

H. fossilis'te 8 ppm malathion etkisinde 4 ve 8 gün sonunda kas ve karaciğer dokusunda glikojen miktarı azalırken, plazma glukoz miktarının arttığı, serbest yağ asidi miktarının ise değişmediği; 16 gün sonunda glukoz ve glikojen miktarının değişmediği, serbest yağ asidi miktarının ise arttığı saptanmıştır (Lal ve ark., 1986).

Cyprinus carpio'da 2 ppm malathion etkisinde beyin dokusunda 7. ve 15. günde protein değerlerinin azaldığı, amino asit miktarı ve proteaz aktivitesinin arttığı saptanmıştır (Mohideen ve Reddy, 1987).

Channa punctatus'ta 120 gün süre ile 0.56, 0.28, ve 0.19 ppm malathion etkisinde beyin dokusunda AChE aktivitesinin doza bağlı olarak azaldığı, oysa 0.72, 0.36, 0.24 ppb endosülfan etkisinde AChE aktivitesinde önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Inbaraj ve Haider, 1988).

Ictalurus punctatus'ta 4.5 mg/mL malathion etkisinde 48, 72 ve 96 saat sonunda eritrosit miktarı artarken lökosit miktarı azalmıştır. Hematokrit ve hemoglobin miktarı 72 ve 96 saat sonunda önemli düzeyde artmıştır. Aynı çalışmada balıklarda omurga deformasyonu görülmüştür (Areechon ve Plumb, 1990).

Malathion ve γ -BHC uygulaması *H. fossilis*'te yıllık üreme döngüsünün yumurtlama sonrası fazı dışındaki evrelerde estradiol miktarını azaltırken testosteron miktarını üreme döngüsünün tüm evrelerinde azaltmıştır. γ -BHC'nin malathion'a göre daha toksik etkili olduğu bildirilmiştir (Singh ve Singh, 1992).

Brachidanio rerio'da 24, 72, 144 ve 288 saat süre ile 0.26, 0.52, 1.04 ve 2.08 ppm diazinon etkisinde beyin dokusunda AChE aktivitesinin zamana bağlı olarak inhibe olduğu bildirilmiştir (Ansari ve ark., 1987).

C. carpio'da 2 ppm methidathion etkisinde 24 saat süre sonunda karaciğer ve beyin dokusunda AChE aktivitesinde %80 – 90 oranında azalma olduğu bildirilmiştir (Nemscók ve ark., 1990).

C. carpio'da 5 gün süre ile 2 ppm methidathion etkisinde AChE aktivitesinin beyin, kalp dokusu ve kanda %90 – 92, karaciğer dokusu ve iskelet kasında ise %70 – 75 oranında azaldığı bildirilmiştir (Bálint ve ark., 1995).

Anguilla anguilla'da beyin dokusunda 0.02 ve 0.04 ppm fenithrothion etkisinde AChE aktivitesinin doz arttıkça azaldığı bildirilmiştir (Sancho ve ark., 1997).

Balaton Gölü'nün (Macaristan) iki farklı kıyısından toplanan *A. anguilla*'da AChE aktivitesinin %50 inhibe olduğu saptanmıştır (Bálint ve ark., 1997).

A. anguilla'da 96 saat süre ile 0.22 ppm thiobencarb etkisinde göz dokusunda spesifik AChE aktivitesinin %75 oranında azaldığı, maksimum azalmanın 12. saatte meydana geldiği saptanmıştır (Sancho ve ark., 2000).

A. anguilla'da 96 saat süre ile 0.22 ppm thiobencarb etkisinde beyin dokusunda AChE aktivitesinin 2. saatten itibaren azaldığı, toplamda %20 inhibisyon meydana geldiği bildirilmiştir. Depurasyon süresince AChE aktivitesinde inhibisyon gözlenmemiş tam aksine enzim aktivitesinde artma meydana gelmiştir (Fernández-Vega ve ark., 2002).

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

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

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

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

I. punctatus'ta s, s, s-tri-n-butyl phosporothionate ve metaboliti n-butyl mercaptan etkisinde MDA ve GSH miktarında önemli düzeyde değişim olmadığı bildirilmiştir (Mather-Mihaich ve Di Guilo, 1986).

Dichlorvos etkisinde *C. carpio*'da karaciğer, böbrek, solungaç, kalp, kas ve beyin dokularında lipit peroksidasyonunun arttığı, en çok beyinde artış olduğu ve en yüksek GSH miktarının da beyinde olduğu bildirilmiştir (Hai ve ark., 1997).

Tilapia zillii, *C. carpio* ve *O. niloticus*'ta 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile 0.03 ve 0.05 ppm azinphosmethyl etkisinde MDA miktarındaki değişimlerin araştırıldığı çalışmada *T. zillii*'de MDA miktarı artarken *C. carpio* ve *O. niloticus*'ta değişim olmadığı bildirilmiştir (Oruç ve ark., 2002).

C. auratus'ta 15 gün süre ile 0.2, 0.4 ve 0.8 ppm 3,4 dichloroaniline etkisinde karaciğer dokusunda MDA miktarının arttığı, GSH miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2003).

C. auratus'ta karaciğer dokusunda 0.1 ppm 2,4-dichlorophenol etkisinde GSH miktarının azaldığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2005).

Carassius auratus gibelio'da 2 hafta süre ile 50, 200µg/mL hexachlorobenzene ve 200µg/mL hexachlorobenzene+50µg/mL β-hexachlorocyclohexane etkisinde serum 17β-estradiol miktarının doza bağlı olarak

arttığı, 11-ketotestosteron miktarının düşük düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Zhan ve ark., 2000).

Pimephales promelas'ta 21 gün süre ile methoxychlor ve methyltestosterone uygulamasının plazma testosteron ve estradiol miktarlarına etkileri araştırılmıştır. Methoxychlor erkek balıklarda testosteron miktarını önemli derecede azaltırken, estradiol miktarını değiştirmemiştir, dişi balıklarda estradiol miktarını azaltırken testosteron miktarını değiştirmemiştir. Methyltestosterone etkisinde erkek balıklarda testosteron miktarı azalırken, estradiol miktarı değişmemiştir. Dişi balıklarda ise hem testosteron hem de estradiol miktarı azalmıştır (Ankley ve ark., 2001).

Dişi *H. fossilis*'te 10, 1, 0.1 ppm γ -hexachlorocyclohexane etkisinde testosteron ve 17 β -estradiol miktarı tüm dozlarda azalırken, erkek *H. fossilis*'te testosteron miktarı 1 ve 10 ppm dozlarında azaldığı, 0.1 ppm'de bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Singh ve Canario, 2003).

L. macrochirus'ta 24, 48, 72, 96 saat ve 1, 2 hafta süre ile 60 μ g/L diazinon uygulamasının estradiol miktarına etkileri araştırılmıştır. 24 saat ve 2 hafta süre sonunda estradiol miktarı belirlenememiştir. 48, 72 ve 96 saat sonunda estradiol miktarında azalma gözlenirken 1 hafta sonunda 96. saatteki estradiol miktarına oranla artış gözlenmiştir (Dutta ve Maxwell, 2005).

Rhamdia quelen'de 3.6 ppm glyphosate etkisinde kortizol miktarının 40. günde önemli derecede arttığı, estradiol miktarının azaldığı, testosteron miktarının değişmediği bildirilmiştir (Soso ve ark., 2006).

Malathionun *C. carpio*'da oksidatif stres aracılığıyla endokrin bozucu etkisi olup olmadığı bugüne kadar araştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, beyin dokusunda malathion toksisitesinin göstergesi olarak AChE inhibisyonu ile oksidatif stresi belirlemek için GSH ve MDA miktarları ölçülmüştür. Serumda kortizol, estradiol ve testosteron miktarlarındaki değişimler belirlenerek malathionun *C. carpio*'da endokrin bozucu etkisi araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOD**3.1. Materyal****3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

Asetik Asit (Merck): CH_3COOH

Asetilkolin İyodür (Sigma)

Bovine Albumin (Sigma)

Etilendiamintetraasetik asit (Sigma): $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$

Etopropazin (Sigma): $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S} \cdot \text{HCl}$

Folin-Ciocalteu Fenol Ayracı (Sigma)

Glasiyal Metafosforik Asit (Sigma-Aldrich):

Piridin (Riedel-de Haën)

Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck): KH_2PO_4

Sodyum Dihidrojen Fosfat (Merck): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Sigma-Aldrich):

Sodyum Hidroksit (Merck): NaOH

Sodyum Karbonat (Sigma): Na_2CO_3

Sodyum Klorid (Sigma-Aldrich):

Sodyum Potasyum Tartarat (Sigma)

Sodyum Sitrat (Sigma-Aldrich):

Sükroz (Sigma): $\text{O}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$

1-Butanol (Merck): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$

1, 1, 1, 3 Tetrametoksipropan (Aldrich): $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{O}_4$

2-Tiyobarbitürik Asit (TBA, Sigma-Aldrich): $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$

5-5'-Ditiyo-bis (2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB, Sigma): $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$

3.1.2. Kullanılan Aletler

Analitik terazi (Sartorius)

Benmari (Memmert)

Buz makinesi (Uğur Soğutma Makinaları Buzal 60)

Distile su cihazı (Kotterman 1034)
Homojenizatör (Janke&Kunkel Ultra-Turrax T 25)
Manyetik karıştırıcı (Janke&Kunkel IKAMAG RH)
Oksijen metre
Otomatik pipet (Gilson)
pH metre (WTW Multi 350i)
Santrifüj (Hettich EBA 8S)
Santrifüj (Heraus Labofuge 400)
Soğutmalı santrifüj (Sigma 2-16K)
Terazi (CECIL)
UV spektrofotometre (Shimadzu UV mini 1240)
UV spektrofotometre (Varian Carry 50 Bio UV- Visible Spectrophotometer)
Vorteks (Janke&Kunkel IKA VF2)

3.1.3. Deney Materyali

Ergin olmayan *C. carpio* (76.80 ± 2.45 g ağırlıkta ve 17.12 ± 0.19 cm boyda) örnekleri Devlet Su İşleri yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Laboratuvarda 12 saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Suyun fiziko-kimyasal özellikleri, sıcaklık 17.3 ± 0.05 °C, pH 7.98 ± 0.03 , çözülmüş oksijen 9.42 ± 0.11 , alkalinite 204.7 ppm CaCO_3 ve sertlik 262 ppm CaCO_3 olarak belirlenmiştir. Balıklar ağırlıklarının %3'ü kadar hazır yem ile günde iki kez beslenmişlerdir. Kontrollü denemelerde pestisit olarak malathion [S-1,2-bis (ethoxycarbonyl) ethyl 0,0-dimethyl phosphorodithioate, 650 g/L Safa Tarım] uygulanmıştır.

3.2. Metod

Denemeler 120 L dinlendirilmiş musluk suyu içeren ve içerisinde 16 adet balık bulunan 4 adet akvaryum ile yürütülmüştür. Akvaryumlardan birisi kontrol akvaryumu olarak seçilmiş, diğer akvaryumlara sırasıyla 0.01 ppm, 0.05 ppm, 0.1 ppm dozlar 1, 15 ve 30 gün sürelerle uygulanmıştır. Pestisit uygulama sürelerinden

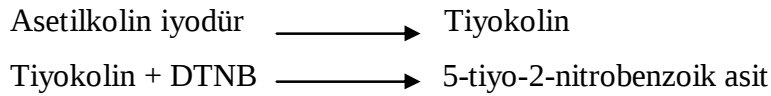
sonra balıklar 15 gün pestisit bulunmayan ortamda bekletilmiştir. Su-pestisit derişiminde oluşabilecek değışimleri engellemek amacıyla akvaryum suları 24 saat aralıklarla değıştirilmiştir. Deneme süreleri sonunda her akvaryumdan 4 balık alınarak kuyrukları kesilmiş ve kan örnekleri santrifüj tüplerine konduktan sonra balıklar disekte edilerek beyin dokuları alınmıştır. Dokular soğuk fizyolojik tuz çözeltisi (%0.59 NaCl) ile yıkandıktan sonra analizlere kadar -70 °C’de saklanmışlardır.

Beyin dokusu 1/5 olacak şekilde 0.25M pH 7.4 sükroz tamponda, cam-teflon homojenizatör (Janke&Kunkel Ultra-Turrax T 25) ile 10000 rpm’de 1.5 dakika homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar +4 °C’de 9000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant AChE aktivitesi ile GSH, MDA ve protein miktarlarının spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.1. Nörotoksisitenin Belirlenmesi

Organofosfatlı insektisitler AChE inhibisyonu yolu ile toksik etkilerini gösterirler. Kolinesterazlar, asetilkolinin tiyokolin ve asetata parçalanma reaksiyonunu katalizler. Ürün olarak açığa çıkan tiyokolin oranı ile DTNB’nin reaksiyonu sonucu sarı renk veren 5-tiyo-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 412 nm dalga boyunda ölçülür (Ellman ve ark., 1961).

Kolinesteraz



Ayırıcılar

1. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH8.0)
2. 0.1 M Na-K Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. 0.01 M DTNB
4. 8.52×10^{-3} M Etopropazin (BChE inhibitörü, günlük olarak hazırlanır)
5. 0.0015 M Asetilkolinyodür (günlük olarak hazırlanır)

Yöntem

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesini belirlemek üzere Çizelge 3.1.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Fosfat Tamponu	2700	2550
Örnek	200	200
DTNB	100	100
Etopropazin	-	50
Çalkalanır ve 5 dakika 30°C'de inkübe edilir.		
Asetilkolinyodür	-	100

Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda 0. ve 5. dakikadaki absorbanları ölçülür.

Hesaplama

$$\text{AChE aktivitesi (U/mL)} = \frac{\text{OD}_5 - \text{OD}_0}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times \frac{1}{13.6}$$

OD₅: 5. dakikadaki absorban,

OD₁: 1. dakikadaki absorban,

V_t: Toplam hacim,

V₀. Örnek hacmi.

3.2.2. Oksidatif Stresin Belirlenmesi

3.2.2.1. Malondialdehit Yöntemi

Lipit peroksidasyonu oksidatif stresin göstergesidir. Malondialdehit lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir göstergedir. Malondialdehit, aerobik

koşullarda pH 3.4'te TBA ile 95°C'de 30 dakika inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark., 1979).

Ayıraçlar

1. % 8.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS)
2. % 20 Asetik asit (HAc) (pH 3.5)
3. % 0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3.5)
4. n-Butanol-Piridin (nBu-Piri) çözeltisi (15/1)
5. Stok standart: 1, 1, 3, 3 tetrametoksipropan (yoğunluk: 0.99 g/mL)

Standart Eğri Çalışması

Günlük standart: Stok standarttan 6.6 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanır . 400 nmol/mL'lik günlük standart hazırlanmış olur. Daha sonra 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanır ve standart eğri çizimi için Çizelge 3.2.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.2. Malondialdehit Standart Eğri 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 soğutulur.							
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 çalkalanır ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbansı okunur.

Yöntem

Malondialdehit miktarını belirlemek üzere Çizelge 3.3.'te gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.3. Malondialdehit Yöntemi

Çözeltiler (mL)	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 soğutulur.			
Saf su	1.0	1.0	1.0
nBu/Piri	5.0	5.0	5.0

Kuvvetli şekilde çalkalanır ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm dalga boyunda verdiği absorbanslar kaydedilir. Elde edilen sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

3.2.2.2. Glutatyon Yöntemi

İndirgenmiş GSH glutamat, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptittir; hücrel oksidatif stresin önlenmesinde, elektrofillerin detoksifikasyonunda ve hücre içi tiol dengesinin korunmasında önemlidir. Oluşan kompleksin şiddeti 412 nm dalga boyunda ölçülür (Beutler, 1975).

Ayıraçlar

1. Çöktürücü çözelti: 1.67 g glasiyal metafosforik asit, 0.2 g disodyum EDTA, 30 g sodyum klorid 100 mL saf suda çözülür.

2. 0.3 M Na₂HPO₄

3. DTNB çözeltisi

Yöntem

1mL örnek üzerine 1.5 mL çöktürücü çözelti eklenerek 5 dakika beklenir ve süzgeç kağıdından süzülür. Süpernatant alınarak GSH miktarını belirlemek üzere çizelge 3.4.'te verilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.4. Glutasyon Yöntemi

Çözeltiler (mL)	Kör	Örnek
Süpernatant	-	0.5
Çöktürücü çözelti	0.3	-
Fosfat tamponu	2	2
Saf su	0.2	-
	412 nm'de OD ₁ okunur	
DTNB	0.25	0.25
	412 nm'de OD ₂ okunur	

Hesaplama;

$$\text{GSH miktarı (U/mg protein)} = \frac{d}{1000} = \frac{\Delta_{OD}/13600 \times 5/2}{\text{Protein (mg/mL)}}$$

Δ_{OD} : OD₂ - OD₁

d: Derişim

3.2.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Proteinler bir çoğu 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 ayıracını (Folin-Ciocalteu) indirgerler. Bu yöntemde proteinler ilk olarak bakır-peptid bağı-protein kompleksini

oluşturmak üzere alkali çözeltide Cu^{+2} ile reaksiyona girerler. Ortama Folin-Ciocalteu ayırıcı eklendiğinde, indirgeme süreci içerisinde bakır-protein kompleksleri ile tirozin, triptofan kalıntıları birleşirler. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür (Lowry ve ark., 1951).

Ayıraçlar

1. Alkali Na_2CO_3 çözeltisi (%2 Na_2CO_3)
2. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Na-K tartarat çözeltisi
 - a) %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - b) %2 Na-K tartarat
3. Alkali çözelti (günlük olarak hazırlanır): 50 mL alkali Na_2CO_3 ve 2 numaralı çözelti ile karıştırılarak hazırlanır.
4. Folin-Ciocalteu Ayırıcı: 1 mL Folin-Ciocalteu, 1.5 mL saf su ile karıştırılarak istenilen hacimde hazırlanır.

Standart Eğri Çalışması

Sığır albümini kullanılarak 1000 $\mu\text{g/mL}$ derişimde stok protein çözeltisi hazırlanır. Çalışma için çözeltiden 100, 200, 300, 400 ve 500 $\mu\text{g/mL}$ derişimlerde standartlar hazırlanır. Standart eğri çizimi için Çizelge 3.4.'te gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.5. Protein Standart Eğri Çalışması

Çözeltiler (mL)	Kör	100 ($\mu\text{g/mL}$)	200 ($\mu\text{g/mL}$)	300 ($\mu\text{g/mL}$)	400 ($\mu\text{g/mL}$)	500 ($\mu\text{g/mL}$)
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 bekletilir.						
FolinCiocalteu	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda verdikleri absorbanslar kaydedilir. Elde edilen değerler standart eğri çiziminde kullanılır.

Yöntem

Protein miktarını belirlemek üzere Çizelge 3.5.'te gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.6. Protein Yöntemi

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

Oda ısısında 30 dakika bekletildikten sonra 750 nm dalga boyunda absorbans değerleri kaydedilir. Elde edilen değerler standart eğriden değerlendirilir.

3.2.4. Steroid Hormon Düzeylerinin Belirlenmesi

Kan örnekleri Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi'nde 3000 rpm'de (Labofuge 400, Heraeus) 5 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Elektrokemilüminesans yöntemiyle (E-170 Modüler Sistem, Roche Diagnostik) kortizol (Katalog no: 11875116), estradiol (Katalog no: 03000079) ve testosteron (Katalog no: 11776061) miktarları belirlenmiştir.

3.2.1.5. İstatiksel Analiz

Veriler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki fark OneWay ANOVA, gruplar arasındaki farkın derecesi SNK

testi kullanılarak belirlenmiştir. Analizlerde SPSS 16.0 Paket Programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Malathionun farklı subletal derişimlerinin etkisinde *C. carpio*'da kanda kortizol, estradiol ve testosteron, beyin dokusunda AChE aktivitesi ile GSH, MDA ve protein miktarları belirlenerek çizelge ve şekiller halinde sunulmuştur.

4.1. Beyin Dokusu

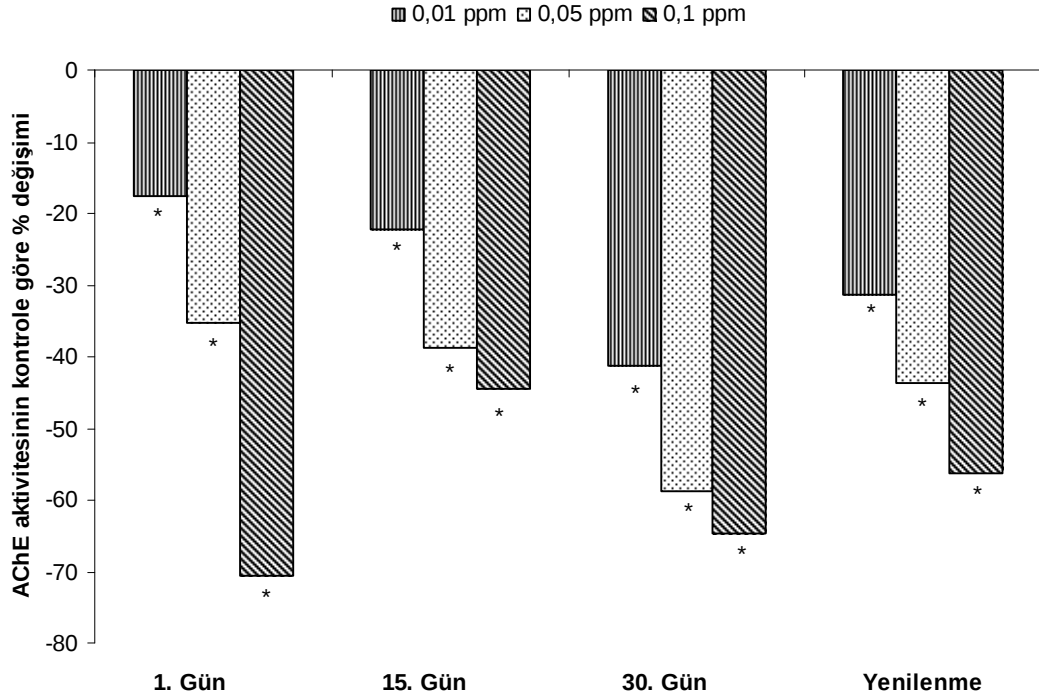
4.1.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkisi

Malathionun 0.01 ppm, 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimleri beyin AChE aktivitesini kontrole göre sırasıyla 1. günde %17.64, %35.29, %70.58; 15. günde %22.22, %38.88, %44.44; 30. günde %41.17, %58.82, %64.70 oranında azaltmıştır. Pestisit bulunmayan ortamda bekletilen balıklarda enzim inhibisyonunun %31.25, %43.75, %56.25 oranında devam ettiği yenilenmenin meydana gelmediği görülmüştür ($p < 0.05$, Çizelge 4.1, Şekil 4.1)

Çizelge 4.1. *C. carpio*'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30 günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda AChE (U/mg protein) aktivitesindeki değişimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	0,0017±0,00 abx	0,0018±0,00 bx	0,0017±0,00 abx	0,0016±0,00 ax
0,01 ppm	0,0014±0,00 ay	0,0014±0,00 ay	0,0010±0,00 by	0,0011±0,00 cy
0,05 ppm	0,0011±0,00 az	0,0011±0,00 az	0,0007±0,00 bz	0,0009±0,00 cz
0,10 ppm	0,0005±0,00 at	0,0010±0,00 bt	0,0006±0,00 at	0,0007±0,00 ct

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b ve c harfleri süreler; x, y, z ve t harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. $p < 0.05$ önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.1. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda AChE (U/mg protein) aktivitesinin kontrole göre % değişimi.

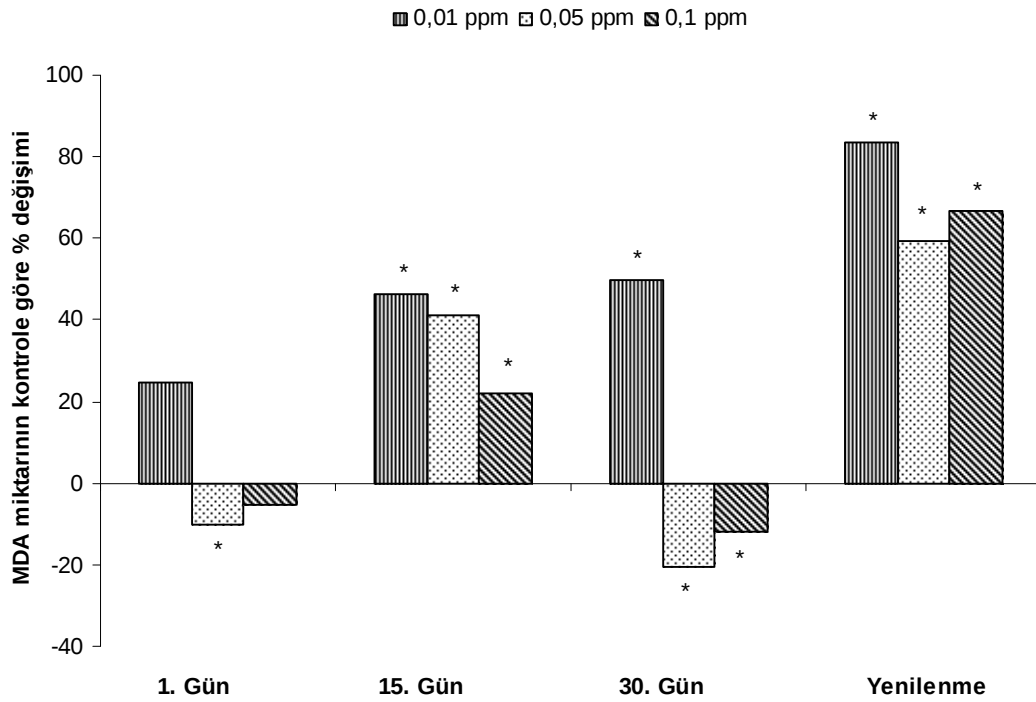
4.1.2. Malondialdehit Miktarına Etkisi

Malathionun 0.01 ppm derişimi 1. günde MDA miktarını %24.79 oranında arttırırken 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimleri MDA miktarını istatistik olarak önemli derecede değiştirmemiştir. 0.01 ppm, 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimleri 15. günde MDA miktarını sırasıyla %46.28, %41.02, %22.17 oranında arttırmıştır. 30. günde ise en düşük derişim MDA miktarını %49.93 oranında arttırırken, 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimleri MDA miktarını sırasıyla %20.70 ve %11.90 oranında azaltmıştır. Malathion etkisinde bırakıldıktan sonra pestisit bulunmayan ortamda 15 gün süre ile bekletilen balıklarda ise MDA miktarı kontrole göre artmıştır ($p < 0.05$, Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Çizelge 4.2. *C. carpio*'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30 günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda MDA (nmol/mg protein) miktarındaki değişimler.

	SÜRE			
	1gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	08,47±0,17 ax	07,80±0,16 abx	07,39±0,17 bx	07,45±0,30 bx
0,01 ppm	10,57±0,33 ay	11,41±0,05 ay	11,08±0,02 ay	13,66±0,27 by
0,05 ppm	07,62±0,28 ax	11,00±0,05 by	05,86±0,03 cz	11,85±0,43 bz
0,10 ppm	08,03±0,31 ax	09,53±0,27 bz	06,51±0,18 ct	12,41±0,12 dz

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b ve c harfleri süreler; x, y, z ve t harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. p<0.05 önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.2. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda MDA (nmol/mg protein) miktarının kontrole göre % değişimi.

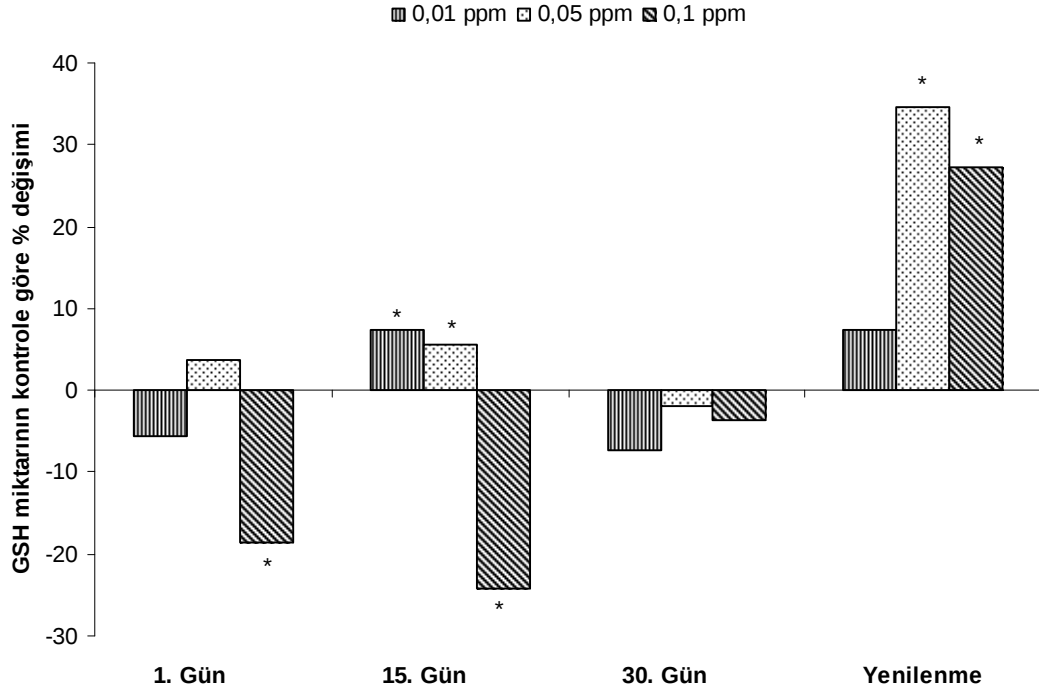
4.1.3. Glutasyon Miktarına Etkisi

Malathionun 0.01 ppm ve 0.05 ppm derişimleri 1. ve 30. günlerde glutasyon miktarını istatistik olarak önemli derecede değıştirmezken 15. günde sırasıyla %7.27, %1.81 oranında artma bulunmuştur. Malathionun 0.1 ppm derişimi 1. ve 15. günlerde glutasyon miktarını sırasıyla %18.51 ve %24.07 oranında azaltırken 30. günde glutasyon miktarı kontrol düzeyinde bulunmuştur. Malathion etkisinde bırakıldıktan sonra pestisit bulunmayan ortamda 15 gün süre ile bekletilen balıklarda ise glutasyon miktarında bir yenilenme olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$, Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Çizelge 4.3. *C. carpio*'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30 günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda GSH (U/mg protein) miktarındaki değışimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	0,0054±0,00 ax	0,0054±0,00 ax	0,0055±0,00 ax	0,0055±0,00 ax
0,01 ppm	0,0051±0,00 ax	0,0058±0,00 by	0,0051±0,00 ax	0,0059±0,00 bx
0,05 ppm	0,0056±0,00 ax	0,0057±0,00 ay	0,0054±0,00 ax	0,0074±0,00 by
0,10 ppm	0,0044±0,00 ay	0,0041±0,00 az	0,0053±0,00 bx	0,0070±0,00 cy

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b ve c harfleri süreler; x, y ve z harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. $p<0.05$ önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.3. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda GSH (U/mg protein) miktarının kontrole göre % değişimi.

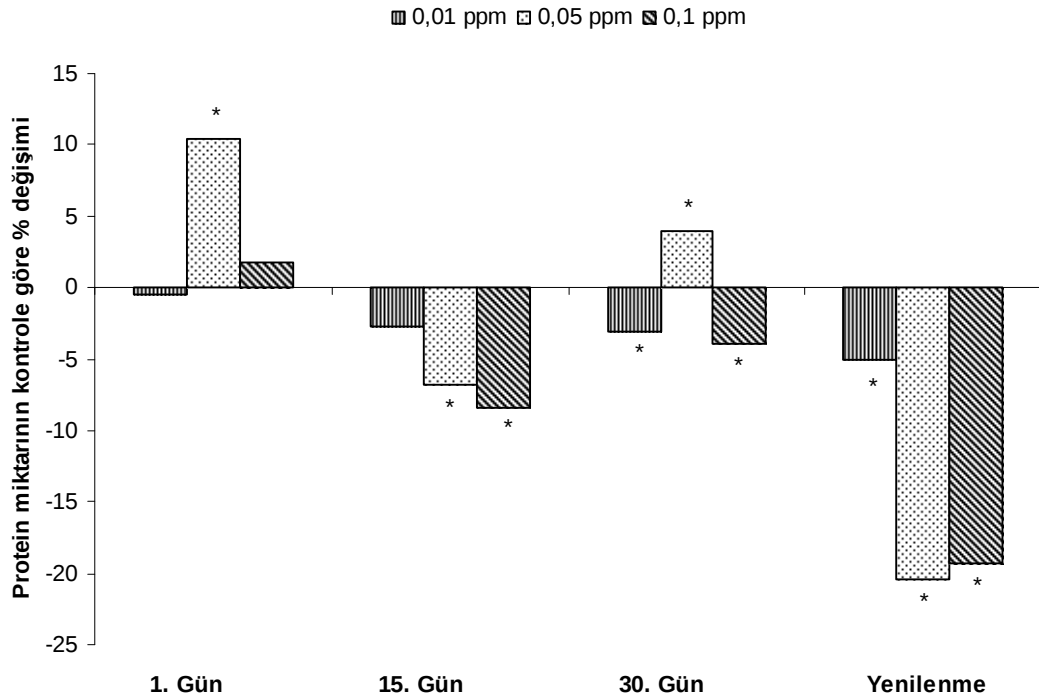
4.1.4. Protein Miktarına Etkisi

Bir gün süre ile 0.01 ppm ve 0.1 ppm malathion etkisinde bırakılan *C. carpio* örneklerinde protein miktarı değişmezken 0.05 ppm derişimde protein miktarı %10.43 oranında artmıştır. 15 gün süre ile 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimde protein miktarı sırasıyla %6.84, %8.36 oranında azalmıştır. 0.01 ppm ve 0.1 ppm malathion derişimi 30. günde protein miktarını sırasıyla %3.14, %3.93 oranında azaltırken 0.05 ppm derişim protein miktarını % 3.93 oranında arttırmıştır. 15 günlük yenilenme süresinden sonra, malathion derişimlerinin etkisinin uzaklaştırılamadığı ve tüm deneme gruplarında protein miktarının kontrolden istatistik olarak önemli derecede az olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$, Çizelge 4.4, Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. *C. carpio*'da subletal malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30 günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda protein (mg/mL) miktarındaki değişimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	2,30±0,006 ax	2,63±0,060 bx	2,54±0,020 bx	2,54±0,058 bx
0,01 ppm	2,29±0,060 ax	2,54±0,006 bxy	2,46±0,006 cy	2,41±0,006 cy
0,05 ppm	2,54±0,020 aby	2,45±0,050 ay	2,64±0,020 bz	2,02±0,039 cz
0,10 ppm	2,34±0,020 ax	2,41±0,023 by	2,44±0,020 cy	2,05±0,000 cz

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b ve c harfleri süreler; x, y ve z harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. $p<0.05$ önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.4. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra beyin dokusunda protein (mg/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.

4.2. Kan Dokusu

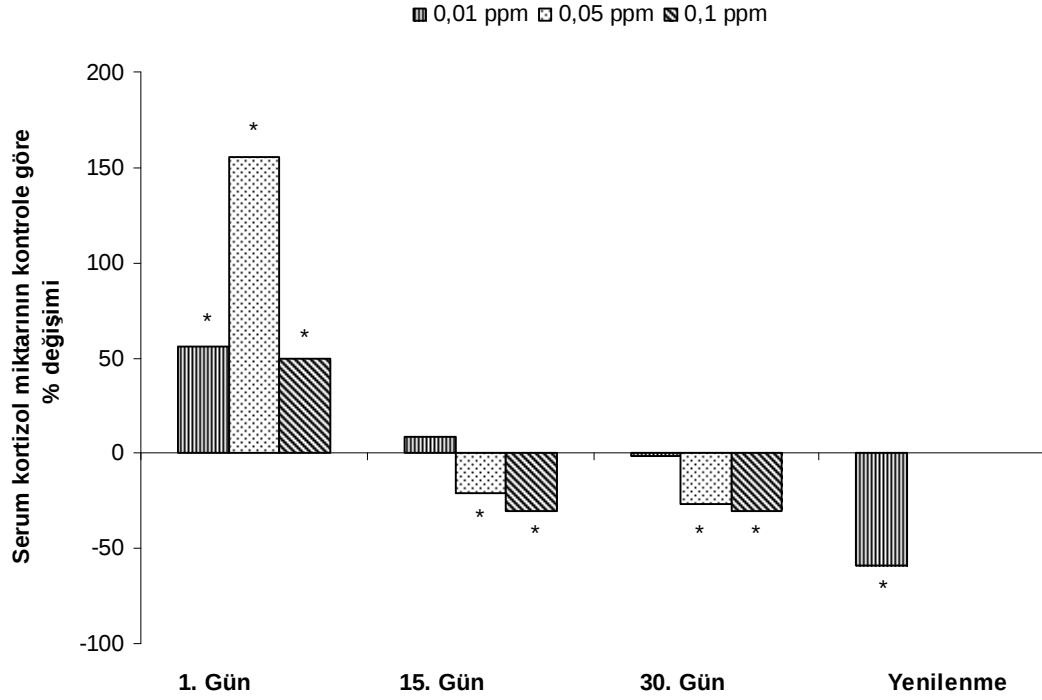
4.2.1. Serum Kortizol Miktarına Etkileri

Bir gün süreyle 0.01 ppm, 0.05 ppm ve 0.1 ppm malathion etkisinde bırakılan *C. carpio*'da serum kortizol miktarı kontrole göre sırasıyla %56.02, %155.49, %49.37 oranında artmıştır. 15. ve 30. günlerde 0.01 ppm derişim etkisinde kortizol miktarının kontrol düzeyinde kaldığı, 15. günde 0.05 ppm ve 0.1 ppm derişimlerin etkisinde kortizol miktarının sırasıyla %21.50, %30.6 oranında, 30. günde %27.02, %29.95 oranında azaldığı bulunmuştur. Pestisit bulunmayan ortamda 15 gün bekletilen balıklarda düşük derişim etkisinde kortizol miktarı kontrolden daha az bulunurken diğer derişimler etkisinde kortizol miktarının kontrol düzeyine ulaştığı bulunmuştur ($p<0.05$, Çizelge 4.5, Şekil 4.5) .

Çizelge 4.5. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum kortizol (ug/dL) miktarındaki derişimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	24,83±0,96 ax	20,65±1,15 bx	36,26±0,07 cx	63,01±0,43 dx
0,01 ppm	38,74±0,60 ay	22,39±0,66 bx	35,55±0,56 cx	25,50±0,50 dy
0,05 ppm	63,44±0,00 az	16,21±0,39 by	26,46±0,33 cy	63,44±0,00 ax
0,10 ppm	37,09±1,71 ay	14,33±0,45 by	25,40±0,80 by	63,44±0,00 dx

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b, c ve d harfleri süreler; x, y ve z harfleri derişimler arası ayrımı göstermektedir. $p<0.05$ önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.5. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum kortizol (ug/dL) miktarının kontrole göre % değişimi.

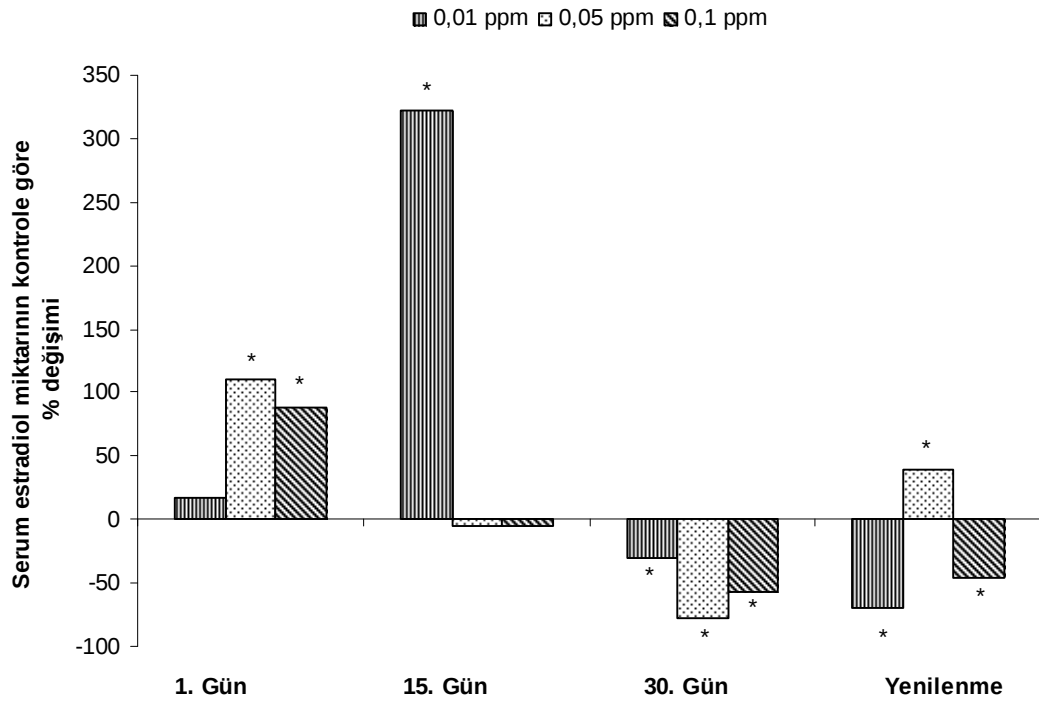
4.2.2. Serum Estradiol Miktarına Etkileri

Malathionun en düşük derişiminin etkisinde serum estradiol miktarı 1. günün sonunda kontrole aynı düzeyde kalırken 15. günde kontrole göre %321.9 oranında bir artma, 30. günde kontrole göre %29.91 oranında bir azalma saptanmıştır. 0.05 ppm ve 0.1 ppm malathion derişimleri 1. günde serum estradiol miktarını sırasıyla %110.93 ve %88.67 oranında arttırmıştır. 15. günde kontrol düzeyine ulaşan estradiol miktarı 30. günde sırasıyla %77.31 ve % 56.14 oranında azalmıştır. 15 günlük yenilenme süresinden sonra, malathion etkisinin uzaklaştırılamadığı ve serum estradiol miktarının kontrolden istatistik olarak önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$, Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

Çizelge 4.6. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum estradiol (pg/mL) miktarındaki değişimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	12,98±0,77 ax	05,25±0,25 bx	32,36±0,01 cx	139,00±1,40 dx
0,01 ppm	15,18±0,70 ax	22,15±0,70 by	22,68±1,46 by	041,64±0,35 cy
0,05 ppm	27,38±0,05 ay	05,00±0,00 bx	07,34±0,95 bz	193,55±1,25 cz
0,10 ppm	24,49±1,31 ay	05,00±0,00 bx	14,19±0,58 ct	076,13±2,57 dt

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b, c ve d harfleri süreler; x, y, z ve t harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. p<0.05 önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.6. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum estradiol (pg/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.

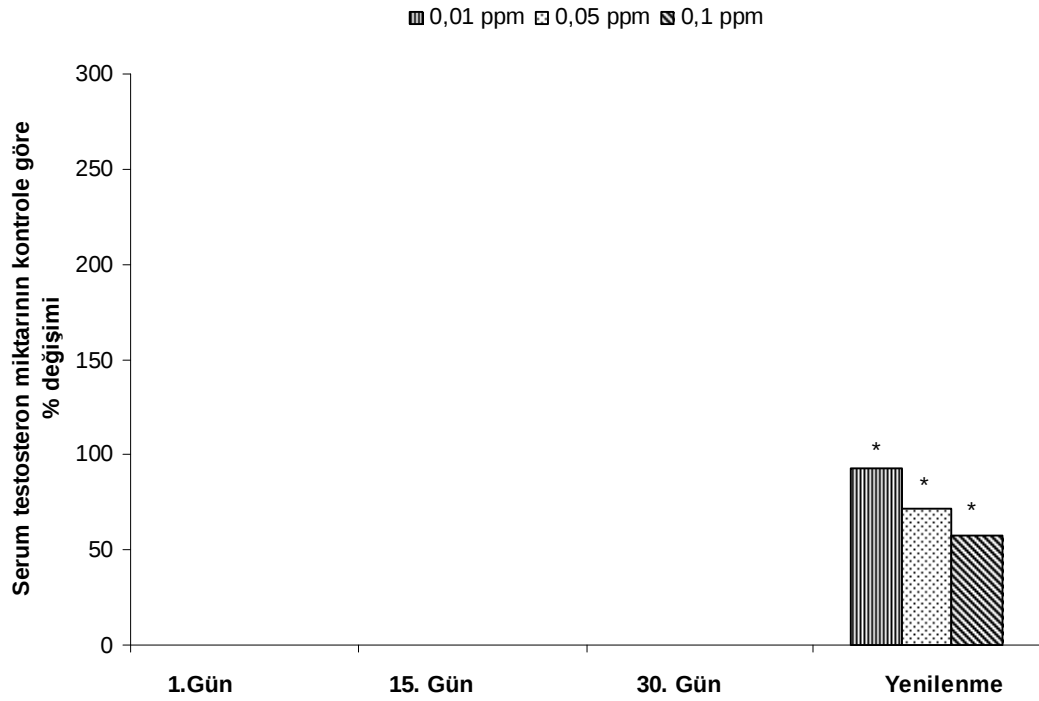
4.2.3. Serum Testosteron Miktarına Etkileri

Farklı malathion derişimleri 1, 15 ve 30 gün deneme sürelerinde testosteron miktarını etkilememiştir. Ancak 15 günlük yenilenme süresinden sonra testosteron miktarı kontrole göre sırasıyla %92.85, %71.42 ve %57.14 oranında artmıştır ($p<0.05$, Çizelge 4.7, Şekil 4.7).

Çizelge 4.7. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30 günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum testosteron (ng/mL) miktarındaki değişimler.

	SÜRE			
	1 gün	15 gün	30 gün	Yenilenme
DERİŞİM				
Kontrol	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,14±0,004 bx
0,01 ppm	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,27±0,020 by
0,05 ppm	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,24±0,006 by
0,10 ppm	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,02±0,000 ax	0,22±0,017 by

Değerler aritmetik ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a ve b harfleri süreler; x ve y harfleri derişimler arasındaki ayrımı göstermektedir. $p<0.05$ önemli kabul edilmiştir.



Şekil 4.7. *C. carpio*'da malathion derişimlerinin etkisinde 1., 15., 30. günlerde ve 15 gün yenilenme süresinden sonra serum testosteron (ng/mL) miktarının kontrole göre % değişimi.

5. TARTIŞMA

Organofosfatlı insektisit kirliliğinin belirlenmesinde AChE aktivitesi inhibisyonu biobelirteç olarak sıklıkla kullanılmaktadır.

C. carpio'da denenen malathion derişimleri AChE aktivitesinde önemli derecede bir azalmaya neden olmuştur. AChE aktivitesindeki bu azalma organofosfatlı pestisit etkisinde kalmanın bir göstergesidir, ayrıca AChE'nin yenilenmesi için 15 günlük sürenin yeterli olmadığı gösterilmiştir. Malathionun 2 ppm derişiminin 60 saat etkisinde *Tilapia mossambica*'da beyin, kas, solungaç ve karaciğer dokusunda AChE aktivitesinde önemli derecede azalma belirlenmiştir (Sahib ve ark., 1980). *Channa punctatus*'ta 120 gün süre ile 0.56, 0.28, ve 0.19 ppm malathion etkisinde beyin dokusunda AChE aktivitesi doza bağlı olarak azalmıştır. 0.72, 0.36, 0.24 ppb endosülfan etkisinde AChE aktivitesinde önemli bir değişim olmadığı belirtilmektedir (Inbaraj ve Haider, 1988). Chlorpyrifosun 26 ppb derişiminin 96 saat etkisinde *Oreochromis mossambicus*'ta beyin ve solungaç dokularında AChE aktivitesi %88 azalmıştır (Rao ve ark., 2003). Fenithrothionun 0.004 ppm etkisinde *Salmo salar*'da beyin dokusunda AChE aktivitesinin kontrol düzeyine gelmesi için 1 haftadan daha kısa sürede pestisit bulunmayan ortamda bekletilmesinin yeterli olduğu, fakat 0.08 ppm'den yüksek derişimler için bu sürenin minimum 6 haftaya çıktığı belirtilmektedir (Morgan ve ark., 1990). Organofosforlu pestisit etkisiyle azalan AChE aktivitesinin pestisit bulunmayan ortamda tutulan balıklarda kontrol düzeyine gelebilmesi için uzun süre gerektiği bildirilmektedir (Ferrari ve ark., 2004, Sancho ve ark., 1998). Phosphorothioate fenithrothionun 96 saat 0.02 ppm etkisinde *A. anguilla*'da AChE aktivitesinin %51 azaldığı ve 92 saat depurasyon süresi sonunda aynı kaldığı belirtilmektedir (Sancho ve ark., 1998).

Lipit peroksidasyonu başlıca biyolojik zarlara zarar vermektedir. Peroksidasyona karşı hücrenin duyarlılığının azalması hücresel membranlardaki lipit kompozisyonunun değişmesi özellikle de poliansatüre yağ asitlerinin belirgin derecede azalması, membranın yapısal özelliklerinin değişmesiyle açıklanmıştır (Masotti ve ark., 1988). Reaktif oksijen türlerin açık hedefleri olmaları ve hücre membranında yoğun bulunmaları nedeniyle, poliansatüre yağ asitlerinin

peroksidasyonları oksidatif stresin önemli bir göstergesidir (Li ve ark., 2003). GSH miktarının ve diğer antioksidant savunmanın düşük olması ve yüksek poliansatüre yağ asiti içeriği nedeniyle beyin dokusu lipit peroksidasyonuna oldukça açık bir sistemdir (Pena-Llopis ve ark., 2001).

MDA, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir (Kamal ve ark., 1989). Bu çalışmada malathion etkisinde MDA miktarının yüksek bulunması lipit peroksidasyonuna işaret etmektedir. Lipit peroksidasyonu meydana gelmemesi veya düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir. *H. fossilis*'te dichlorvos etkisinde MDA miktarının doza bağlı olarak arttığı belirtilmektedir (Vadhva ve Hasan, 1986). *C. auratus*'ta 15 gün süre ile 0.2, 0.4 ve 0.8 ppm 3,4 dichloroaniline etkisinde karaciğer dokusunda MDA miktarının arttığı, GSH miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2003).

GSH, içerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Glutasyon redoks döngüsündeki değişimler nedeniyle oksidatif stres oluşabilir. Bu nedenle de GSH kirlilik boyutunun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Pena-Llopis ve ark., 2003a).

Malathionun yüksek derişimlerinin etkisinde kaldıktan sonra pestisit bulunmayan ortamda 15 gün tutulan balıklarda düşük derişim dışında glutasyon miktarında bir yenilenme olduğu belirlenmiştir. Buna göre 15 günlük sürenin malathionun pro-oksidad etkilerin giderilmesi için yeterli olduğu düşünülebilir. Dringen (2000) GSH miktarındaki azalmanın, kan yoluyla beyne iletilmesi gereken GSH veya yapıtaşlarının karaciğerde henüz yeterli düzeyde sentezlenmemiş olmasına bağlı olabileceğini belirtmektedir.

Organofosforlu dichlorvos etkisinde *C. carpio*'da beyin dokusunda lipit peroksidasyonunda meydana gelen azalmanın GSH miktarındaki artışa bağlı olabileceği bildirilmektedir (Hai ve ark., 1997). *A. anguilla*'da herbisit molinata karşı dirençlilik glutasyon metabolizması ile açıklanmıştır. Molinat etkisindeki balıkların hepatik GSH miktarlarının arttığı, fakat muskular GSH miktarlarının azaldığı belirtilmiştir. Molinata dirençli *A. anguilla*'da en yüksek GSH miktarı

karaciğer dokusunda bulunurken hassas olanlarda ise tam tersi bulgular gözlenmiştir (Pena-Llopis ve ark., 2001). Thiobencarb etkisindeki *A. anguilla*'da hepatik GSH miktarlarının kontrole göre arttığı belirtilmektedir (Pena ve ark., 2000). Buthionine sulfoximinin etkisinde 48 saat sonunda *I. punctatus*'ta hepatik GSH düzeyleri önemli derecede değişmezken 72. saat sonunda GSH düzeylerinde %21 oranında azalma belirlenmiştir. Diethylmaleate etkisinde 2. ve 6. saatlerde hepatik GSH miktarının %27 ve %15 azaldığı belirtilmektedir (Gallagher ve ark., 1992). Pandey ve ark. (2003) kirlenmiş Panipat bölgesinde *Wallago attu*'da hepatik GSH düzeylerinin yüksek olduğunu ve bu durumun kimyasal kontaminantlarla kirlenmede oksidatif strese karşı GSH'ın koruyucu özelliğinden kaynaklandığını belirtmişlerdir.

T. mossambica'da malathion etkisinde protein miktarının arttığı, bu artışın toksik stresten kaynaklanabileceği ve balıkların protein kayıplarını karşılamak için protein sentezini arttırdıkları belirtilmektedir. Protein miktarındaki azalmanın hidrolitik aktivitenin artmasına ya da protein sentezinin bozulmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Reddy ve ark., 1991).

Pestisit etkisinde balıkların karaciğer dokusunda lipit ve protein düzeyindeki azalma, bunların sentezlerindeki redüklenmeye veya yüksek mobilizasyona işaret etmektedir (Saxena ve ark., 1989). Malathionun subletal dozları etkisine bırakılan *Cyprinus carpio*'da, 7. ve 15. gün süreyle total protein, yapısal protein ve çözünebilir proteinlerde bir artış belirtilmektedir. Uygulamanın 30. gününde bu değerler normale yakın olarak ortaya çıkmaktadır (Westernhagen, 1988). *H. fossilis*'te, 14 gün 10 ppm dimethoate etkisinde, böbrek ve karaciğer dokularında protein miktarları azalmıştır. Karaciğer dokusunda 35 günlük sürede protein miktarının aşamalı olarak arttığı belirlenmiştir (Awashi ve ark., 1984). *C. batrachus*'ta 40 gün 0.5 ppm malathion etkisinde karaciğer dokusunda protein miktarlarında önemli değişimler olmadığı belirtilmektedir (Mukhopadhyay ve Dehadrai, 1980).

Çevresel endokrin bozucular olarak adlandırılan hormon benzeri aktiviteye sahip bazı sentetik kimyasal bileşiklerin uzun süreli etkisinde kalan organizmalarda akut ve kronik sorunların ortaya çıkabileceği bildirilmektedir (Nimrod ve Benson, 1996). Endokrin bozucu kimyasallar; homeostasis ve gelişim işlevlerinden sorumlu hormonların üretimi, salınımı, taşınımı, eliminasyonu ile regülasyonu dolayısıyla

metabolizmayı olumsuz etkilemektedirler (Ferguson ve ark., 2000). Karaciğer steroid metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır, metabolizmadaki düşüş yüksek plazma düzeylerinin oluşmasına ve gonadotropin hipofiz sekresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Kime, 2001). Bazı kimyasal bozucuların doz-yanıt eğrilerinin lineer olmamasının sebebi yüksek ve düşük dozların farklı etkilerinden dolayı olabilmektedir (Matthiessen ve Johnson, 2007).

Elverişsiz çevre koşulları sonucu oluşan stres teleost balıklarda hipotalamus-hipofiz-interrenal hücreler ekseninin son ana ürünü olan plazma kortizolün ölçülmesiyle değerlendirilir. Estradiol sentezinin veya salınımının kortizol tarafından baskılanabildiği fakat reproduksiyon esnasında oluşan streste kortizolün baskılayıcı etkisine dair kanıtların olmadığı da belirtilmektedir.

Malathion uygulaması nedeniyle başlangıçta kortizol miktarı artarken ilerleyen sürelerde yüksek derişimlerde kortizol miktarında görülen azalmalar balıklarda pestisit etkisinde stres oluştuğunu göstermektedir. *Rhamdia quelen*'de 3.6 ppm glyphosate uygulamasının kortizol miktarını 40. günde önemli derecede arttırdığı, estradiol miktarını azalttığı, testosteron miktarını ise deney boyunca değiştirmedeği belirtilmektedir. Balıkların deney boyunca insan, hayvan ve makine sesleri gibi dış etkilere maruz kaldıklarında, kortizol miktarındaki artışın beklenen bir olay olduğu ve stres altında olmayan balıklarda kortizol miktarının 1 ng/mL'den düşük olması gerektiği belirtilmektedir. Estradiol miktarının 40. günde kontrole göre oldukça düşük, kortizol miktarının ise yüksek olması estradiol üretimi veya salınması üzerinde kortizolün etkisinin olduğunu göstermektedir (Soso ve ark., 2006).

Malathionun yüksek derişimleri ilk gün, düşük derişimi ise 15. günden sonra serum estradiol miktarına etki etmiştir. Pestisit bulunmayan ortamda 15 gün bekletilen balıklarda malathion etkisinin uzaklaştırılamadığı ve serum estradiol miktarının kontrolden farklı olduğu bulunmuştur. Malathion etkisinde *C. carpio*'da serumda testosteron miktarı kontrole göre önemli derecede değişmemiştir. Pestisit etkisi uzaklaştırıldıktan sonra testosteron miktarında kontrole göre meydana gelen artışın karaciğerde steroid metabolizmasının azalması yolu ile yüksek plazma düzeylerinin oluşmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Kime, 2001). *L. macrochirus*'ta 24, 48, 72, 96 saat ve 1, 2 hafta süre ile 60 µg/L diazinon

uygulamasının estradiol miktarına etkileri araştırılmıştır (Dutta ve Maxwell, 2005). 24 saat ve 2 hafta süre sonunda estradiol miktarı belirlenememiştir. 48, 72 ve 96 saat etkisinde kalma süreleri sonunda azalma gözlenirken 1 hafta sonunda 96. saatteki estradiol miktarına oranla artış gözlenmiştir. Dişi *H. fossilis*'te γ -hexachlorocyclohexanenin 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm derişimleri etkisinde testosteron ve 17β -estradiol miktarı tüm dozlarda azalırken erkek *H. fossilis*'te testosteron miktarının 1 ppm ve 10 ppm dozlarında azaldığı, 0.1 ppm'de ise bir değişim olmadığı belirtilmiştir (Singh ve Canario, 2003). Fenarimol etkisinde dişi *Pimephales promelas*'ta plazma estradiol miktarı artarken plazma testosteron miktarı önemli derecede değişmemiştir. Prochloraz etkisinde plazma estradiol miktarı derişime bağlı olarak azalmış, testosteron miktarı değişmemiştir. Erkek *Pimephales promelas*'ta fenarimol ve prochloraz etkisinde plazma estradiol miktarı değişmemiştir. Testosteron miktarı yüksek prochloraz derişiminde azalırken fenarimol etkisinde değişmemiştir (Ankley ve ark., 2005).

Toksikantların subletal düzeylerinin steroidogenez ve reproduksiyonda önemli rolü olan enzim aktivitelerini değiştirdiği görülmektedir. Plasma cinsiyet steroidlerinin azalması gonadın biosentetik kapasitesinin ya doğrudan östrojen sentezinden sorumlu aromatzasyon aktivitesinin inhibisyonu yolu ile ya da dolaylı olarak steroidogenezini stimule etmekten sorumlu gonadotropin sekresyonunun baskılanması yolu ile değişmesine işaret etmektedir (Singh ve Singh, 1992).

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Asetilkolinesteraz aktivitesinin derişime bağı olarak azaldığı ve malathionun denenen düşük derişimlerinin etkisinde bile *C. carpio*'da beyin dokusunda nörotoksisite oluştuğı belirlenmiştir.

Denemelerde MDA miktarında görülen değışimler antioksidant savunma sisteminin aktif olduğunu, ancak 15 günlük yenilenme süresinin oksidatif stresin uzaklaştırılması için yeterli olmadığını göstermektedir.

Malathion etkisinde kortizol miktarındaki değışimler balıklarda fizyolojik stres oluştuğunu bildirmektedir.

Pestisit etkisinde 30 gün süreyle estradiol ve MDA miktarındaki dalgalanmalar dikkat çekicidir. Pestisit etkisi uzaklaştırıldıktan sonra yapılan analizlerde MDA miktarındaki artışla birlikte estradiol miktarının da artmış olduğu belirlenmiştir.

30 gün süreyle malathion etkisine bırakılan *C. carpio*'da testosteron miktarı değışmemiştir. Ancak akvaryumlardan uzaklaştırılmış olmakla birlikte, pestisit balıktaki birikimi nedeniyle 15 günlük yenilenme süresinden sonra testosteron miktarının azaldığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- AKKUŞ, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
- ALLEN, RG., VENKATRAJ, V.S., 1992. Oxidants and Antioxidants in Development and Differentiation. *Journal of Nutrition*, 122: 631-5.
- ANKLEY, G.T., JENSEN, K.M., KAHL, M.D., KORTE, J.J., MAKYNEN, E.A., 2001. Description and Evaluation of A Short-Therm Reproduction Test with The Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 1276-1290.
- ANKLEY, G.T., JENSEN, K.M., DURHAN, E.J., MAKYNEN, E.A., BUTTERWORTH, B.C., KAHL, M.D., VILLENEUVE, D.L., LINNUM, A., EARL GREY, L, CARDON, M., WILSON, V.S., 2005. Effects of Two Fungicides with Multiple Modes of Action on Reproductive Endocrine Function in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 86: 300-308.
- ANSARI, B.A., ASLAM, M., KUMAR, K., 1987. Diazinon Toxicity: Activities of Acetylcholinesterase and Phosphatases in the Nervous Tissue of Zebra Fish *Brachidanio rerio* (Cyprinidae). *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, 15(3): 301-306.
- AREECHON, N., PLUMB, J.A., 1990. Sublethal Effects of Malathion on Channel Catfish *Ictalurus punctatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 435-440.
- AWASTHI, M., SHAH, P., DUBALE, M. S., GADHIA, P., 1984. Metabolic Changes Induced by Organophosphates in the Piscine Organ. *Environmental Research*, 35: 320-325.
- BAJGAR , J., 1992. Biological Monitoring of Exposure to Nerve Agents. *British Journal of Ophthalmology*, 49:648-653.
- BAJGAR, J., 2004. Organophosphates/Nerve Agents Poisoning: Mechanism of Action, Diagnosis, Prophylaxis and Treatment. *Advances In Clinical Chemistry*, 38: 152-153.

- BÁLINT, T., SZEGLETES, T., SZEGLETES, Zs., HALASY, K., NEMSCOK, J., 1995. Biochemical and Subcellular Changes in Carp Exposed to Organophosphorus Methidathion and the Pyrethroid Deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33: 279-295.
- BÁLINT, T., FERENCZY, J., KATAI, F., KISS, I., KRACZER, L., KUFCOSK, O., LANG, G., POLYHOS, C., SZABO, I., SZEGLETES, T., NEMSCOK, J., 1997. Similarities and Differences Between the Massive Eel (*Anguilla anguilla* L.) Devastations that Occurred in Lake Balaton in 1991 and 1995. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37: 17-23.
- BANERJEE, B.D., SETH, V., BHATTACHARYA, A., PASHA, S.T., CHAKRABORTY, A. K., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33-47.
- BEUTLER, E., DURON, O., KELLY, B. M., 1963. Improved Method for the Determination of Blood Glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 61: 882-90.
- BEUTLER, E., 1975. Red Cell Metabolism. *A Manual of Biochemical Methods*. Grune and Stratton, New York, London, 67-69.
- BISSON, M., HONTELA, A., 2002. Cytotoxic and Endocrine-Disrupting Potential of Atrazine, Diazinon, Endosulfan, and Mancozeb in Adrenocortical Steroidogenic Cells of Rainbow Trout Exposed in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 180: 110-117.
- BOROCHOV, H., ABBOT, R.E., SCHACHTER, D., SHINITZKY, M., 1979. Modulation of Erythrocyte Membrane Proteins by Membrane Cholesterol and Lipid Fluidity. *Biochemistry*, 18: 251-5.
- BRETAUD, S., TOUTANT, J., SAGLIO, P., 2000. Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47: 117-124.
- BURATTI, F. M., TESTAI, E., 2005. Malathion Detoxification by Human Hepatic Carboxylesterases and its Inhibition by Isomalathion and Other Pesticides. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19: 406-414.

- CALDWELL, J., 1983. Biological Basis of Detoxification. Academic Press, 125-7, 244, 352.
- CHANDRASEKERA, L.K.H.U., PATHIRATNE, A., 2005. Response of Brain and Liver Cholinesterases of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* to Single and Multiple Exposures of Chlorpyrifos and Endosulfan. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 1228-1233.
- CHIOU, T., TZENG, W., 2000. The Roles of Glutathione and Antioxidant Enzymes in Menadione-Induced Oxidative Stress. Toxicology, 154: 75-84.
- ÇOKUĞRAŞ, A.N., 2003. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. Türk Biyokimya Dergisi, 28(2): 54-61.
- DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C., 2003. Toxicity of Cypermethrin in *Labeo rohita* Fingerlings: Biochemical, Enzymatic and Haematological Consequences. Comparative Biochemistry and Physiology, 134C: 109-121.
- DESIDERI A, FALCONI M, 2003. Prokaryotic Cu, Zn Superoxidies Dismutases. Biochemical Society Transactions, 31: 1322–1325.
- DORVAL, J., HONTELA, A., 2003. Role of Glutathione Redox Cycle and Catalase in Defense Against Oxidative Stress Induced by Endosulfan in Adrenocortical Cells of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toxicology and Applied Pharmacology, 192: 191-200.
- DRINGEN, R., 2000. Metabolism and Functions of Glutathione in Brain. Progress in Neurobiology, 63: 229-241.
- DUTTA, H.M., ARENDS, D.A., 2003. Effects of Endosulfan on Brain Acetylcholinesterase Activity in Juvenile Bluegill Sunfish. Environmental Research, 91: 157-162.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. Biochemistry and Pharmacology, 7: 88-95.
- FERGUSON, S.A., SCALLET, A.C., FLYNN, K.M., MEREDITH, J.M., SCHWETZ, B.A., 2000. Developmental Neurotoxicity of Endocrine Disrupters: Focus on Estrogens. Neurotoxicology, 21(6): 947-956.

- FERNÁNDEZ-VEGA, C., SANCHO, M.D., ANDREU, E., 2002. Thiobencarb-Induced Changes in Acetylcholinesterase Activity of the Fish *Anguilla anguilla*. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 72: 55-63.
- FERRARI, A., VENTURINO, A., PECHEN de D'ANGELO, A.M., 2004. Time Course of Brain Cholinesterase Inhibition and Recovery Following Acute and Subacute Azinphosmethyl, Parathion and Carbaryl Exposure in the Goldfish (*Carrassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 420-425.
- GALLAGHER, E.P., HASPIELER, B.M. DI GIULIO, R.T., 1992. Effects of Buthionine Sulfoximine and Diethyl Maleate on Glutathione Turnover in the Channel Catfish. *Biochemical Pharmacology*, 43: 2209-2215.
- GANONG, W.F., 2003. Review of Medical Physiology. Twenty-first edition. San Fransisco: The McGraw-Hill Companies; 367s.
- HAI, D.Q., VARGA, Sz.I., MATKOVICS, B., 1997. Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C: 83-88.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. C., 2001. Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- [http:// extoxnet.orst.edu](http://extoxnet.orst.edu)
- ISHIBASHI, H., WATANABE, N., MATSUMURA, N., HIRANO, M., NAGAO, Y., SHIRATSUCHI, H., KOHRA, S., YOSHIHARA, S., ARIZONO, K., 2005. Toxicity to Early Life Stages and an Estrogenic Effects of a Bisphenol a Metabolite, 4-Methyl-2,4-bis (4-hydroxyphenyl) pent-l-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sciences*, 77: 26643-2655.
- INBARAJ, R.M., HAIDER, S., 1988. Effects of Malathion and Endosulfan on Brain Acetylcholinesterase and Ovarian Steroigenesis of *Chana punctatus* (Blonch). *Ecotoxicology an Environmental Safety*, 16: 123-128.
- KAMAL, A.A., GOMAA, A., EL KHAFIF, M., HAMMAD, A.S., 1989. Plasma Lipid Peroxides Among Workers Exposed to Silica or Asbestos Dust. *Environmental Research*, 49: 173-180.
- KANG, Y.J., 1997. Exogenous Glutathione Decreases Cellular Cadmium Uptake and Toxicity, *Drug Metabolism and Disposition*, 20: 714-718.

- KIME, D.E., 2001. Endocrine Disruption in Fish. Kluwer Academic Publishers, USA, 396s.
- LAL, B., SINGH, A., KUMARI, A., SINHA, N., 1986. Biochemical and Haematological Changes Following Malathion Treatment in The Fresh Water Catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Environmental Pollution, 42A: 151-156.
- LI, W., YIN, D., ZHOU, Y., H. U., S., WANG, L., 2003. 3,4 Dichloroaniline-Induced Oxidative Stress in Liver of Crucian carp (*Carassius auratus*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 56: 251-255.
- LIOCHEV, S.I., FRIDOVICH, I., 2002. The Haber-Weiss Cycle — 70 Years Later: An Alternative View, Redox Report, 7: 55–57.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.
- MAMETT, L.J., 1999. Lipid peroxidation — DNA Damage by Malondialdehyde, Mutation Reserch/Fundamental Molecular Mechanisms of Mutagen, 424: 83–95.
- MARRS, T.C., BALLANTYNE, B. Pesticide Toxicology and International Regulation. John Wiley & Sons, 554 s.
- MASOTTI, L., CASALI, E., GESMUNDO, N., SARTOR, G., BORELLO, S., PIRETTI, M.V., PAGLIUCA, G., 1988. Lipid Peroxidation in Cancer Cells: Chemical and Physical Studies. Annals of The New York Academy of Sciences, 551: 47-57.
- MATHER-MIHAICH, E., DI GIULIO, R.T., 1986. Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde, Glutathione and Methemoglobin Concentrations in Channel Catfish Exposed to DEF and N-Butyl Mercaptan. Comparative Biochemistry and Physiology, 85: 427-432.
- MATTHIESSEN, P., JOHNSON, I., 2007. Implications of Research on Endocrine Disruption for the Environmental Risk Assesment, Regulation and Monitoring of Chemicals in the European Union. Environmental Pollution, 146: 9-18.

- MAXWELL, L.B. and DUTTA, H. M., 2005. Diazinon Induced Endocrine Disruption in Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60 :21-27.
- MCKENZIE, W., 2001. Agrochemical Service: The World Market in 2000. In: Annual Review of the Crop Protection Association. Peterborough: Crop Protection Association.
- MEISTER, A, ANDERSON, M.E., 1983. Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52: 711-760.
- MEISTER, R.T., ed. 1999. Farm Chemicals Handbook '99. Willoughby, OH, USA, Meister Publishing Company.
- MISHRA, J., SRIVASTAVA, A.K., 1983. Malathion Induced Hematological and Biochemical Changes in the Indian Catfish *Heteropneustes fossilis*. *Environmental Research*, 30: 393-398.
- MOHIDEEN, B., REDDY, P.M., 1987. Changes in The Brain Protein Profiles of Freshwater Fish *Cyprinus carpio* Under Malathion Stress. *Zeitschrift fuer Angewandte Zoologie*, 74: 293-297.
- MORGAN, M.J., FANCEY, L.L., KICENIUK, J.W., 1990. Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Exposed to Fenitrothion. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 1652-1654.
- MUKHOPADHYAY, P.K., DEHADRAI, P.V., 1980. Biochemical Changes in The Air-Breathing Catfish *Clarias batrachus* (Linn.) Exposed to Malathion. *Environmental Pollution*, 22A: 149-158.
- NEMSCÓK, J., RAKONCZAY, Z., KASA, P., ASZTALOS, B., SZABO, A., 1990. Effects of Methidathion on Distribution of Molecular Forms of Acetylcholinesterase in Carp, as Revealed by Density Gradient Centrifugation. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 37: 140-144.
- NIMROD, A.C., BENSON W.H., 1996. Environmental Estrogenic Effects of Alkylphenol Etoxylates. *Critical Reviews in Toxicology*, 26(3): 335-364.

- NYSKA, A., KOHEN, R., 2002. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30: 620–650.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., TAGI, K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Chemistry*, 95: 351-358.
- ORUÇ, E.Ö., SEVGİLER, Y., ÜNER, N., 2004. Evaluation of Etoxazole Toxicity in the Liver of *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry & Physiology*, 78: 1-8.
- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N., TAMER, L., 2002. Comparison of Na⁺K⁺-ATPase Activities and Malondialdehyde Contents in Liver Tissue for Three Fish Species Exposed to Azinphomethyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69: 271-277.
- PATHIRATNE, A.S., GEORGE, G., 1998. Toxicity of Malathion to Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* and Modulation by Other Environmental Contaminants. *Aquatic Toxicology*, 43: 261–271.
- PANDEY, S., PARVEZ, S., SAYEED, I., HAQUE, R., BIN-HAFEEZ, B., RAISUDDIN, S., 2003. Biomarkers of Oxidative Stress: Comparative Study of River Yamuna Fish *Wallago attu* (Bl. & Schn). *The Science of the Total Environment*, 309: 105-115.
- PATOCKA, J., KUČA, K., JUNEK, D., 2004. Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase - Important Enzymes of Human Body. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 47:11-18.
- PEÑA, S., PENA, J.B., RIOS, C., SANCHEZ, E., FERNANDEZ, C., FERRANDO, M.D., 2000. Role of Glutathione in Thiobencarb Resistance in the European Eel *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 51-56.
- PEÑA-LLOPIS, S., PENA, J. B., SANCHEZ, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., 2001. Glutathione-Dependent Resistance of the European Eel *Anguilla anguilla* to The Herbicide Molinate. *Chemosphere*, 45: 671-681.
- PEÑA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2003. Fish Tolerance to Organophosphate- Induced Oxidative Stress is Dependent on Glutathione

- Metabolism And Enhanced By *N*-Acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65: 337-360.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2003a. Increased Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in Dichlorvos-Intoxicated European Eels *Anguilla anguilla* by Bath Treatment with *N*-acetylcysteine. *Diseases of Aquatic Organisms*, 55: 237-245.
- PINCHUK, I., SCHNITZER E., LICHTENBERG, D., 1998. Kinetic Analysis of Copperinduced Peroxidation of LDL. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism*, 1389: 155–172.
- PULLAR, J.M, WINTERBOURN, C.C., VISSERS, M.C., 1999. Loss of GSH and Thiol Enzymes in Endothelial Cells Exposed to Sublethal Concentrations of Hypochlorous Acid. *American Journal of Physiology*, 277(4Pt2): H1505-1512.
- RAO, J.V., RANI, C.H.S., KAVITHA, P., RAO, R.N., MADHAVENDRA, S.S., 2003. Toxicity of Chlorpyrifos to the Fish *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 985-992.
- REDDY, M.P., PHILIP, G.H., BASHAMOHIDEEN, M.D., 1991. Inhibition of Mg^{2+} and Na^+K^+ -ATPases in Selected Tissues of Fish *Cyprinus carpio* Under Fenvalerate Toxicity. *Biochemistry International*, 715-721.
- ROTCHELL, M.J., OSTRANDER, G.K., 2003. Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6B: 453-495.
- SAHIB, I.K.A., SAILATHA, D., RAO, K.V.R., 1980. Toxicity of Malathion to the Freshwater Fish *Tilapia mossambica* (Peters)- A Time Course Study. *Journal of Bioscience*, 2: 37-41.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1997. Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase Activity in The European Eel, *Anguilla anguilla* , Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38: 205-209.

- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1998. *In vivo* Inhibition of AChE Activity in the European Eel *Anguilla anguilla* Exposed to Technical Grade Fenitrothion. *Biochemistry and Physiology*, 120C: 389-395.
- SANCHO, E., FERNÁNDEZ-VEGA, C., SANCHEZ M., FERRANDO, M.D., ANDREU-MOLINER, E., 2000. Alterations on AChE Activity of the Fish *Anguilla anguilla* as Response to Herbicide-Contaminated Water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46: 57-63.
- SAXENA, P.K., SINGH, V.P., KONDAL, J.K., SONI, G.L., 1989. Effects of Some Pesticides on in-vitro Lipid and Protein Synthesis by the Liver of the Freshwater Teleost, *Channa punctatus* (Bl). *Environmental Pollution*, 58: 273-280.
- SIES, H., 1999. Glutathione and Its Role in Cellular Functions. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(9-10): 916-921.
- SINGH, P.B., SINGH, T.P., 1992. Impact of Malathion and γ -BHC on Steroidogenesis in the Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquatic Toxicology*, 22: 69-80.
- SINGH, P.B., CANARIO, A.V.M., 2003. Reproductive Endocrine Disruption in The Freshwater Catfish, *Heteropneustes fossilis*, in Response to The Pesticide γ -Hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58: 77-83.
- SOSO, A.B., BARCELLOS, L.J.G., RANZANI-PAIVA, M.J., KREUTZ, L.C., QEVEDO, R.M., ANZILIERO, D., LIMA, M., BOLOGNASI DA SILVA, L., RITTER, F., BEDIN, A.C., FINCO, J.A., 2006. Chronic Exposure to Sub-Lethal Concentration of a Glyphosate-Based Herbicide Alters Hormone Profiles and Affects Reproduction of Female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 308-313.
- SÖZMEN, E.Y., 2002. Yaşlanma Biyokimyası. In: Onat T, Emerk K, Sözman EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık: 665-74.
- STENERSEN, J., 2004. Chemical Pesticides: Mode of Action and Toxicology. CRC Press, 298s.

- TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI KORUMA VE KONTROL GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, 2006.
- TEXTBOOK OF MILITARY MEDICINE. Office of the Surgeon General at TMM Publications, Department of the Army. Washington DC.,1997. p: 131-196.
- TOROS, S. VE MADEN, S. 1991. Tarımsal Savaşım Yöntem ve İlaçları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 1222, Ders Kitabı No: 352, 332s.
- TREATMENT OF CHEMICAL AGENT CASUALTIES AND CONVENTIONAL MILITARY CHEMICAL INJURIES. Field Manual No. 8-285. Departments of the Army, the Navy, and the Air Force and Joint Manual Commandant Marine Corps.Washington DC.1995. p.2-2.
- VADHVA, P., HASAN, M., 1986. Organophosphate Dichlorvos Induced Dose-Related Differential Alterations in Lipid Levels and Lipid Peroxidation in Various Regions of the Fish Brain and Spinal Cord. Journal of Environmental Science and Health, B21(5), 413-424.
- VALE, J.A., 1998. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorus (Organophosphate) Insecticide Poisoning. Toxicology Letters, 102-103: 649-652.
- WESTERNHAGEN, V.H., 1988. Sublethal Effects of Pollutants on Fish Eggs and Larvae. Fish Physiology, Academic Press, New York, XIA, 253-346.
- YAMAGUCHI, A., ISHIBASHI, H., KOHRA, S., ARIZONO, TOMINAGA, N., 2005. Short-Term Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on The Expression of Estrogen-Responsive Genes in Male Medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology, 72: 239-249.
- ZHAN, W., XU, Y., LI, A.H., ZHANG, J., SCHRAMM, K.-W., KETTRUP, A., 2000. Endocrine Disruption by Hexachlorobenzene in Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 65: 560-566.
- ZHANG, J. F., LIU, H., SUN, Y.Y., WANG, X.R., WU, J.C., XUE, Y.Q., 2005. Responses of the Antioxidant Defenses of the Goldfish *Carassius auratus*, Exposed to 2,4-dichlorophenol. Environmental Toxicology and Pharmacology, 19: 185-190.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2005 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden Biyolog ünvanı ile mezun oldum.

2006 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım.