



**ÇEVRESEL KİRLLETİCİ ETOFENPROKSUN ZEBRA BALIKLARINDA  
(*Danio rerio*) GENOTOKSİK VE HİSTOPATOLOJİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Neslihan AĞIRBAŞLI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
ÇEVRE BİLİMLERİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ŞUBAT 2016**

Neslihan AĞIRBAŞLI tarafından hazırlanan “ÇEVRESEL KİRLETİCİ ETOFENPROKSUN ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*) GENOTOKSİK VE HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Çevre Bilimleri Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Doç. Dr. Aylin Sepici DİNÇEL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**İkinci Danışman:** Doç. Dr. A. Çağlan KARASU BENLİ

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Başkan:** Yrd. Doç. Dr. Feriha YILDIRIM

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Üye:** Doç. Dr. Meltem YILMAZ

Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

**Üye:** Yrd. Doç. Dr. Belda ERKMEN

Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum .....

Tez Savunma Tarihi: 18/02/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Metin GÜRÜ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Neslihan AĞIRBAŞLI

18/02/2016



ÇEVRESEL KİRLLETİCİ ETOFENPROKSUN ZEBRA BALIKLARINDA (*Danio rerio*) GENOTOKSİK VE HİSTOPATOLOJİK

ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Neslihan AĞIRBAŞLI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2016

ÖZET

Bu çalışmada ekotoksikolojik araştırmalarda model organizmalardan olan zebra balığı (*Danio rerio*), etofenproksun sucul ekosistemler üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için kullanılmıştır. Etofenproks (2- (4-etoksifenil) -2-metilpropil 3-fenoksibenzileter), ester olmayan sentetik piretroiddir, haşere kontrol programları tarafından doğrudan olarak su ile ya da dolaylı olarak yağmur suları ve yüzey suları ile vücuda alınabilir. Etofenproks 96. saat LC50 değeri 1/10 (8 ug / L) ve 1/100 (0.8 ug / L), zebra balıklarına 48 ve 96 saat süre ile uygulanmıştır. Ayrıca kontrol grupları da aynı koşullara tabi tutulmuştur. 48 ve 96 saat sonra, doku örnekleri histoloji ve DNA analizi için buz anestezisi altında alınmıştır. Histolojik analiz için her bir gruptan yedi balık örneği%10'luk tamponlu formalin içinde tesbit edilmiştir. Rutin histolojik işlemler yapılarak incelenmiştir. Genomik DNA/RNA oksidatif hasarını değerlendirmek için tüm zebra balıkları, homojenize edilerek DNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra DNA örnekleri hidrolize edilerek, oksidatif hasar 8-hidroksi-2'deoksiguanozin (8OHdG pg/mL) olarak enzim immün assay ile ölçülmüştür. Kontrol gruplarında herhangi bir histolojik bulguya rastlanılmamıştır. Solungaç dokularında hiperemi, ikincil lamel üzerinde epitel ayrılması; karaciğer dokuları üzerinde hiperemi, piknozis ve hidropik dejenerasyon; beyin ve böbrek dokularında hiperemi, ödem ve tubuler dejenerasyon iki farklı subletal etofenproks konsantrasyonuna maruz kalan zebra balıklarında en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır. Bununla birlikte kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki grupta, düşük ve yüksek her iki dozda 8-OHdG (pg/mL) düzeyleri yüksek gözlenmiş, DNA/RNA hasar düzeyi 96 saat yüksek ve düşük doz etofenproksa maruz bırakılan grup ile karşılaştırıldığında 48 saat etofenproksa maruz kalan grupta her iki dozda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak subletal konsantrasyonlarda etofenproksa maruziyetin zebra balıklarında akut genotoksik etki gösterdiği ve doku hasarına yol açtığı, maruziyet süresinin devamı ile tamir mekanizmalarının etkin olabileceği düşünülmüştür.

Bilim Kodu : 90309

Anahtar Kelimeler : Etofenproks, zebra balığı, oksidatif hasar, DNA hasarı

Sayfa Adedi : 76

Danışman : Doç. Dr. Aylin Sepici DİNÇEL

İkinci Danışman : Doç. Dr. A. Çağlan Karasu BENLİ

THE GENOTOXIC AND HISTOPATHOLOGIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL  
POLLUTANT ETOFENPROX  
ON ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

(M. Sc. Thesis)

Neslihan AĞIRBAŞLI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2016

ABSTRACT

Zebrafishes (*Danio rerio*), model organisms on ecotoxicological studies, were used to determine the sublethal effects of etofenprox on aquatic ecosystems. Etofenprox (2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzylether), a non ester synthetic pyrethroid, can enter water bodies directly by pest control programs or indirectly through rain water and surface run off. 1/10 (8 µg/L) and 1/100 (0,8 µg/L) of 96 h LC50 value were applied for 48 and 96 hours to the zebrafishes. Control groups were also conducted under the same conditions. After 48 and 96 hours fish samples were taken under ice anasthesia for histologic and DNA analysis. Seven fish samples were fixed in %10 buffered formalin for each group for histologic analysis. Routine histologic procedures (dehydration in alcohol series, cleared in xylene, embedded in parafin, sectioned and stained with H&E.) were carried out. To evaluate the DNA/RNA oxidative damage, every zebrafish was homogenized for DNA isolation, then hydrolized and damage was measured by commercial kit as EIA. Hyperemia, epithelial lifting on the secondary lamella of the gill tissues; hyperemia, picnosis and hydropic degeneration on the liver tissues; edema and tubuler degeneration on the kidney tissues and hyperemia on the brain tissues were observed after exposing the zebrafishes to two different sublethal etofenprox concentrations. In nuclear and mitochondrial DNA, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, pg/mL) is one of the predominant forms of free radical-induced oxidative lesions and it was statistically significantly increased at low doses of 48 and 96-hour exposed groups. However, at high doses of 48 and 96-hour exposed groups, no statistically significant difference was observed. Etofenprox was found to be very highly toxic to the zebrafishes, non-target organisms, even in sublethal concentrations.

Science Code : 90309

Key Words : Etofenprox, zebrafish, oxidative damage, DNA damage

Page Number : 76

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aylin Sepici DİNÇEL

Co-Supervisor : Assoc. Prof. Dr. A. Çağlan Karasu BENLİ

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde, çalışmanın oluşturulmasında ve yüksek lisans tezimin her aşamasında beni kıymetli fikirleriyle yönlendiren ve daha nitelikli bir çalışma ortaya koymam için beni destekleyerek teşvik eden çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Aylin Sepici DİNÇEL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Bilimleri Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim süresince, sürekli yardım ve tavsiyelerde bulunan, bilgi ve deneyimlerini, görüş ve önerilerini benimle paylaşan çok değerli ikinci danışman hocam Doç. Dr. A. Çağlan Karasu BENLİ'ye yardımları ve sabrı için çok teşekkür ederim.

Ana Bilim Dalı'ndaki eğitimim sırasında, yetişmemde emeği geçen tüm Değerli Öğretim Üyeleri'ne ve çalışmalarım sırasındaki yardımları ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Figen ERKOÇ'a teşekkür ederim.

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Ana Bilim Dalı yardımcı sağlık personeline, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün eğitim hayatım boyunca her türlü başarımın arkasında olan sevgili babam Alaattin KUŞ'a, yükseköğretime yönelmemde en büyük desteği veren canım annem Ergül KUŞ'a, akademik çalışmalarımın her aşamasında maddi ve manevi destekleri ile motivasyonumu her zaman yüksek tutan kardeşlerim Eser KUŞ ve Mansur KUŞ'a minnettarım.

Yüksek lisans eğitimimin her aşamasındaki desteği ve anlayışı ile yanımda olan eşim Halil AĞIRBAŞLI'ya üzerimdeki emeği ve sabrı için çok teşekkür ederim.

İyi ki varsınız...

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. PESTİSİTLER.....	5
2.1. Dünyada Pestisit Kullanımı.....	6
2.2. Türkiye’de Pestisit Kullanımı.....	6
2.3. Pestisit Kullanımının Dezavantajları.....	6
2.4. Kalıntı Problemi ve Zehirlenmeler.....	7
2.5. Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi.....	8
2.6. İnsanlar Üzerine Etkileri.....	9
2.7. Çevre Üzerine Etkileri.....	10
2.7.1. Pestisitlerin yeraltı sularına bulaşması.....	11
2.7.2. Pestisitlerin yüzey sularına bulaşması.....	12
2.8. Gıdaların Kontaminasyonu.....	12
2.9. Pestisitlerin Güvenli ve Etkili Uygulama Koşulları.....	13
2.10. Pestisitlerin Sınıflandırılması.....	14
2.11. Sentetik Piretroidler.....	15
2.11.1. Etofenproks.....	16
3. SERBEST RADİKALLER.....	19

	<b>Sayfa</b>
3.1. Serbest Radikal Kaynakları.....	19
3.1.1. Endojen kaynaklar.....	19
3.1.2. Ekzojen kaynaklar.....	20
3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Özellikleri .....	21
3.2.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) .....	21
3.2.2. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) .....	22
3.2.3. Hidroksil radikali ( $OH\bullet$ ).....	22
3.2.4. Singlet oksijen ( $^1O_2$ ).....	22
3.3. Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres .....	23
3.4. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı .....	24
3.5. DNA ve Yapısı.....	25
3.5.1. Reaktif oksijen türlerinin DNA üzerine etkileri.....	25
3.5.2. Oluşan DNA hasarlarının gruplandırılması .....	26
3.5.3. Pürin baz modifikasyonları .....	26
3.6. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları.....	26
3.7. DNA Hasarının Tayini .....	27
3.7.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi+elektrokimyasal tarama (HPLC-ECD)	28
3.7.2. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS).....	29
3.7.3. Post-labeling yöntemi .....	30
3.7.4. Onarım endonükleazları ile oksidatif DNA baz hasarının ölçümü .....	30
3.8. Oksidatif Streste Histolojinin Avantaj ve Sınırları .....	31
3.8.1. Histolojinin avantajları.....	31
3.8.2. Histolojinin sınırları .....	31
4. GEREÇ VE YÖNTEM .....	33
4.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması .....	33

	<b>Sayfa</b>
4.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	35
4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	35
4.4. Histolojik Preparat Hazırlama .....	36
4.4.1. Doku takibi .....	36
4.4.2. Doku bloklama/Parafin gömme .....	37
4.4.3. Kesit alma .....	38
4.4.4. Dokuları lama alma .....	41
4.4.5. Deparafinizasyon .....	42
4.4.6. Hematoksilen-eosin (HE) boyama .....	43
4.5. DNA Ekstraksiyonu .....	43
4.6. DNA Hidrolizi .....	45
4.7. 8-OHdG Analizi .....	45
5. BULGULAR .....	47
5.1. 8-OHdG Analiz Sonuçları .....	47
5.2. Histopatoloji Sonuçları .....	48
5.2.1. Solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	49
5.2.2. Karaciğer dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	50
5.2.3. Böbrek dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	51
5.2.4. Beyin dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	52
5.2.5. Ovaryum dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	52
5.2.6. Testis dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	53
6. TARTIŞMA .....	57
7. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	61
KAYNAKLAR .....	63
EKLER .....	72
EK.1. Bazı terimler .....	73

ÖZGEÇMİŞ ..... 76



## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Endokrin bozucuların üreme sistemi üzerine etki mekanizmaları.....	9
Çizelge 2.2. <i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> testlerde etofenproksa ait mutajenite test sonuçları....	17
Çizelge 2.3. Etofenproksun sucul akut toksisite sonuçları .....	18
Çizelge 3.1. Reaktif oksijen türlerinin ekzojen ve endojen kaynakları .....	21
Çizelge 4.1. Kapalı sistem doku takip cihazında doku takip uygulaması.....	36
Çizelge 4.2. Deparfinizasyon uygulaması .....	42
Çizelge 4.3. Doku preparatlarının HE boyama–kapatma/montaj uygulama aşamaları	43
Çizelge 4.4. 48. saat balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları .....	44
Çizelge 4.5. 96. saat balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları .....	44
Çizelge 5.1. Subletal dozda (8 µg/L) etofenproksa maruz kalan zebra balıklarının çeşitli dokularında görülen histopatolojik bulgular .....	55

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Pestisit gruplarına göre Türkiye’de tarım ilacı kullanımı.....	6
Şekil 2.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı .....	6
Şekil 2.3. Etofenproksun kimyasal formülü .....	17
Şekil 3.1. DNA’nın yapısı.....	25
Şekil 3.2. HPLC yöntemi ile aminoasitlerin tetkiki a) 200 pmol aminoasit standart içeriği; fosfoserin (PH-S), aspartat (N), glutamat (D), fosfotreonin (PH-T), hidroksiprolin (OH-P), galaktozamin (Gal), serin (S), glisin (G), histidin (H), arjinin (R), treonin (T), alanin (A), prolin (P), tirozin (Y), valin (V), metionin (M), sistein (C), isolizin (I), lösün (L), norlösün (NLE, 1nmol internal standart), fenilalanin (F), artmış reaktif, lizin (K) b) İnsan parmakizi analizi; su ve etanol karışımı kullanarak saat camından alınmış. ....	29
Şekil 3.3. Gaz kromatografik analiz örneği; örnek beyaz şaraptan alınmıştır ve 18 farklı alkol türevine ait pikler görülmektedir [82].....	30
Şekil 5.1. 8-OHdG sonuçları.....	48

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.1. Akvaryum şartlarında deney hayvanlarının hazırlanması .....	34
Resim 4.2. Base moulda doku yerleştirimi .....	37
Resim 4.3. Base moulda doku yerleştirimi .....	37
Resim 4.4. Doku gömme cihazı .....	38
Resim 4.5. Rotary mikrotom ve bölümleri .....	39
Resim 4.6. Disposable bıçak takılması .....	39
Resim 4.7. Disposable bıçağın sıkıştırılması .....	39
Resim 4.8. Blok tutucuya blok yerleştirilmesi.....	40
Resim 4.9. Doku kesiti.....	40
Resim 4.10. Doku kesitinin sıcak su banyosuna atımı.....	41
Resim 4.11. Lama doku alımı .....	41
Resim 4.12. Doku kesiti alınmış lamın doku taşıma sepetine yerleştirilmesi .....	42
Resim 4.13. Nanodrop DNA ölçüm grafiği .....	45
Resim 5.1. Solungaç dokularında epitel ayrılması .....	49
Resim 5.2. Kuppfer hücrelerinde piknozis .....	50
Resim 5.3. Böbrek dokusunda görülen kanama ve dejenerasyon.....	51
Resim 5.4. Beyin dokularında hiperemi .....	52
Resim 5.5. Ovaryumda dejenerasyon .....	53
Resim 5.6. Testiste sperm hücrelerinde azalma ve leydig hiperplazi .....	54

## SİMGELER VE KISALTMALAR

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

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklamalar</b>
$\mu$	Mikron
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{g/L}$	Litrede mikrogram
ng	Nanogram
pg/L	Litrede pikogram
<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>BER</b>	Base excision repair
<b>DDT</b>	( <i>dikloro difenil trikloroetan</i> ) Çok zehirli ve inatçı, böcek öldürücü, klorlu hidrokarbon grubundan bir pestisittir.
<b>DMSO</b>	Dimetil sülfoksit
<b>ECD</b>	Elektrokimyasal dedektör
<b>EPA</b>	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>H&amp;E</b>	Hematoksilen eosin
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)

**Kısaltmalar****Açıklamalar****HPLC-ECD**

Elektrokimyasal Dedektörlü Yüksek Performans SıvıKromatografisi

**LC 50 (lethal konsantrasyon)**

Kontrollü koşullar altında test hayvan popülasyonlarının en az % 50' sini öldürmek için gerek duyulan toksik maddenin miktarı ya da konsantrasyonudur.

**NAD+**

Okside nikotinamid adenin dinükleotit

**NADH**

Redükte nikotinamid adenin dinükleotit

**NER**

Nucleotide excision repair pathway (nükleotid eksizyononarım yolu)

**NO**

Nitrik Oksit

**NOS**

Nitrik oksit sentaz

**NOX**

Nitrik oksit metabolitleri (nitrat ve nitrit)

**O<sub>2</sub>**

Oksijen

**O<sub>2</sub>·-**

Süperoksid

**OECD**

Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

**ONOO-**

Peroksinitirit

**ONOOH**

Peroksinitröz asit

**RNS**

Reaktif nitrojen türleri

**ROS**

Reaktif oksijen türleri

**8-OHdG**

8-hidroksideoksiguanozin

**8-OHG**

8-hidroksiguanin

**8-oxo-dGTP**

8-okso-7,8-dihidrideoksiguanozin trifosfat

**8-oxoG**

7,8 dihidro-8 okso guanin



## 1. GİRİŞ

Günümüzde bitki zararlılarına karşı kimyasal maddelerle savaşın ekonomik önemi son derece büyüktür. Bu kimyasal maddeler, bugünkü modern yaşamın vazgeçilmez gereksinimleridir. Faydaları yanında, doğrudan maruz kalma veya kullanımları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosisteme zararlı olabilmektedir [1].

Zamanımızda kimyasal maddelerin sayısı 2 milyonun üzerine çıkmıştır. Bunlardan 1500'ünü pestisit aktif maddeleri oluşturmaktadır [1].

Pestisitler tavsiye edilen dozların üzerinde kullanıldıklarında, gereğinden fazla sayıda ilaçlama yapıldığında, gerekmediği halde birden fazla ilaç karıştırılarak kullanıldığında veya son ilaçlama ile hasat dönemi arasında bırakılması gereken süreye uyulmadığı durumlarda gıda maddelerinde fazla miktarda kalıntı bırakabilirler. Yüksek dozda pestisit kalıntısı içeren gıdalarla beslenen insanlarda ve çevredeki diğer canlılarda akut veya kronik zehirlenmelere neden olabildikleri gibi, özellikle bazı ürünlerde aroma ve kalite değişimleri meydana getirebilirler [1].

Çevresel kimyasallara maruz kalan insan ve doğadaki canlılarda endokrin süreçler, endokrin bozucu (ED) etki gösterdiklerinden son yıllarda bu konuda yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Birkhoj ve diğerleri 2004 yılında yaptıkları epidemiyolojik araştırma sonuçlarına göre pestisit ve diğer kimyasallara maruz kalındığında insan sağlığının etkilendiğini ve sperm kalitesinin düştüğünü belirtmişlerdir. Doğal hormonlardan daha düşük potensde olmalarına rağmen ED kimyasalları (EDC) su ve gıda yoluyla karışım halinde insana ulaştığından önemli risk oluşturarak çevresel sucül ortamda etkileşerek aditif, sinerjistik, antagonistik etkiler gösterebilmektedir [2].

Mevcut literatürde tüm canlı hayvanlarda endokrin-aracılı advers etkilerin tanımı mevcut değildir, türe özgü memeli ve memeli olmayan (omurgasız, balık, amfibi ve kuş) canlılarda OECD ve EPA'nın endokrin bozucuların taranması hakkındaki yönergeleri de yetersiz kalmaktadır. Değişik zamanlarda farklı laboratuvarlarda yapılan testlerde kalite kontrol çalışmalarında tekrarlanabilirlik sağlanamamıştır.

Hijyenik ve toksikolojik bakımdan pestisitler iki sebepten önem taşır: Birincisi dikkatsiz kullanma sonucu akut zehirlenmelerin sık görülmesi, ikincisi de çevreyi kirletmelerinin çeşitli ekosistemler üzerine bozucu etkisi ve bu durumun sonunda insan sağlığına zarar verme olasılığıdır [3].

Su kütleleri son yıllarda artan oranlarda tarımsal ve endüstriyel kimyasallar içermektedir. Bu kimyasalların sucul canlılar tarafından bünyelerine alınması, su, sediment, suda asılı partikül madde ve besin yoluyla olmaktadır. Organizmalarca metabolizmaya alınan çevresel kirletici kimyasallar, serbest radikaller ile mücadelede rol oynayan metabolik süreçleri alt üst edebilmektedir. Bu nedenle sucul organizmalar, doku ve hücresel hasarın belirlenmesi, hastalık, yaşlanma gibi fizyolojik etkilere sebep olan serbest radikallerden korunma sürecinde model organizma olarak pek çok araştırmada kullanılmaktadır.

Oksijen sucul canlılar için de yaşamsal bir element olmakla birlikte aynı zamanda çok tehlikeli toksik formlar olan serbest radikallere dönüşebilmekte oksidatif strese yol açabilmektedir. Serbest radikaller, dış halkalarında bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunan, kısa ömürlü reaktif atom, iyon veya moleküllerdir. Serbest radikallerin büyük hücresel hasar, mutasyon, kanser ve biyolojik yaşlanmadan sorumlu olduğu bilinmektedir [4]. Balıklarda serbest radikallerin oluşumu, ağır metaller, pestisitler ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakta ve artmaktadır [5]. Tüm organizmalar, serbest radikallerin hücrelerde sebep olduğu oksidatif hasarları önlemek amacıyla, serbest radikal seviyelerini kontrol altında tutmaya çalışırlar [6,7].

Oksidatif stresin, çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynadığının belirlenmesi, son yıllarda bu konuya verilen önemin giderek artmasına neden olmuştur. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi DNA'nın yapısında hasara yol açabilir. Artmış ROS, DNA'nın yanı sıra, lipid ve proteinler gibi makromoleküllerin oksidatif hasarını da hızlandırabilir. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), DNA'da pürin artıklarının ROS ile indüklenen değişiklikleridir. 8-OHdG guaninin 8-hidroksilasyonu sonrası, spesifik enzimatik bölünmeyi takiben oluşan oksidatif DNA hasarının bir ürünüdür. 8-OHdG, oksidatif DNA hasarının ve oksidatif stresin gösterilmesinde önemli ve hassas bir belirleyicidir [8,9].

Oksidatif DNA hasarını, her 30-50 µg DNA'da minimal olduğu için tespit etmek ve hasarın miktarını belirlemek zordur. Bu amaçla çeşitli metodlar geliştirilmiştir.

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan metodların başında, elektrokimyasal dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography with electrochemical detection - HPLC-ECD) gelmektedir [10]. Floyd tarafından geliştirilen bu yöntem ile ılımlı şartlarda nükleositleri ayırtmak ve bileşenleri duyarlı bir şekilde ortaya çıkarmak mümkün olabilmektedir [11].

Bu çalışma ile çevresel kontaminasyona neden olan insektisitlerden etofenproksun zebra balıklarındaki toksisitesinin biyokimyasal ve histopatolojik metotlarla araştırılarak toksikolojik verilere katkı sağlanması amaçlanmaktadır. Ayrıca çevre kirliliğine neden olan insektisitlerin, zebra balıklarındaki toksik etkileri araştırılarak, tüm canlılarda oluşabilecek toksik etkilere karşı korunma ve tedavi yöntemlerinin bulunmasına da katkı sağlanabilecektir.



## 2. PESTİSİTLER

Besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında, besin değerini bozan ve yok eden, zarar veren haşereleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları (pestleri) yok etmek için kullanılan kimyasal savaş maddelerine pestisitler denir [1].

Tarımsal ürünlerin verim ve kalitesini arttırmak için modern tarım tekniklerinin ve girdilerinin kullanılması gerekmektedir. Bitki koruma ürünleri içerisinde yer alan pestisit kullanımı da bu girdilerden biridir ve modern tarımın tamamlayıcı bir bileşenidir. Pestisit kullanımı, tarımsal ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararından koruyabilmek, kaliteli üretimi güvence altına alabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şekli olup, 1940'lı yıllardan beri üretimi arttıran en önemli bileşendir. Kısa sürede etki göstermesi ve kullanımının kolay olması nedeniyle, pestisit kullanımı en çok tercih edilen yöntemdir.

Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, %95'in üzerinde bir paya sahip olan kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde %60'lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü görülmektedir. Bu nedenle, ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır. Ancak, pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve çevreye olumsuz etkileri gibi birçok sorunu da beraberinde getirmektedir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Tüm dünyada tarımsal sistemin ayrılmaz bir parçası olarak pestisit kullanımında tarımsal ürünlerde kalıntı riski ve çevreye olumsuz etki yapması dikkatle üzerinde durulması gereken bir konudur. Ayrıca ruhsatlandırma sonrası, pestisit tarla koşullarında akıbeti ve çevreye olan etkileri de araştırılmalıdır [12].

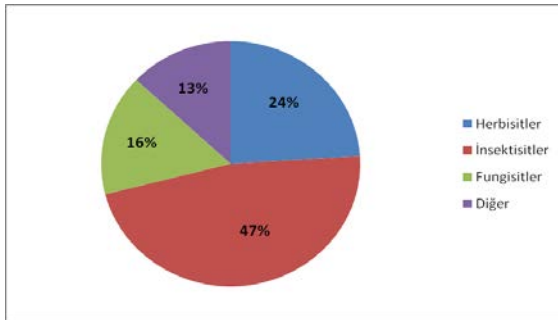
Pestisitler ve metabolitlerinin genel popülasyonda ve mesleki maruz kalımda biyolojik izlenmesi ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Çalışmalar, bu pestisitlerin endokrin bozucu ve non-Hodgkin's lenfoma, lösemi, beyin kanseri, uterus kanseri, yumuşak doku sarkoma, Hodgkin's hastalığı ve düşük sperm konsantrasyonu gibi birçok hastalık için potansiyel risk faktörü olduğunu göstermiştir [1].

## 2.1. Dünyada Pestisit Kullanımı

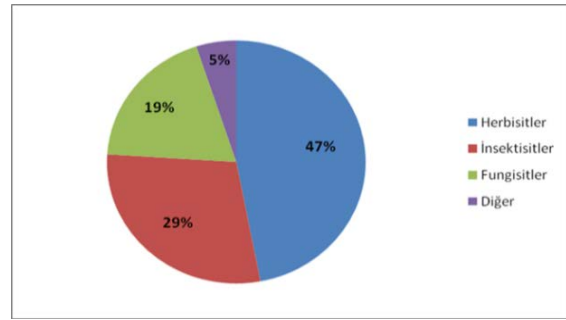
Dünyada tarım ilacı üretimi 3 milyon tondur, yıllık satış tutarı ise 25-30 milyar dolar arasında değişmektedir. Dünya pestisit pazarında tonaj olarak yılda %1 civarında bir büyüme beklenmektedir [13]. Herbisitler tarım ilaçları içinde %47'lik bir payla birinci sırayı almaktadır. Bunu %29 ile insektisitler izlemekte, fungusitlerin ise %19'luk bir payı bulunmaktadır. Herbisitler ve insektisitler, kullanımının %70'den fazla bir bölümünü kapsamaktadır. Diğer pestisit grupları ise %5'lik bir paya sahiptir (Şekil 2.2) [12]. Parasal olarak değerlendirildiğinde tüketimin %31'ini insektisitler, %26'sını herbisitler, %20'sini de fungusitler oluşturmaktadır [13, 14].

## 2.2. Türkiye'de Pestisit Kullanımı

Türkiye'de tarım ilacı tüketimi ortalama 33.000 tondur. Bu miktarın %47'sini insektisitler, %24'ünü herbisitler, %16'sını fungusitler, %13'ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır (Şekil2.1) [12]. Bu pestisitlerin yıllık satış tutarı da yaklaşık 230-250 milyon dolardır [15,16]. Türkiye'de 2008 yılı sonu itibariyle 4100 adet ruhsatlı bitki koruma ürünü bulunmaktadır. Ülkemizde ruhsatlı etkili madde sayısı ise 418 adettir. Ancak AB mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle, 25.08.2014 tarihi itibariyle 177 adet pestisit imalatı ve ithalatı durdurulmuştur.



Şekil 2.1. Pestisit gruplarına göre Türkiye'de tarım ilacı kullanımı



Şekil 2.2. Pestisit gruplarına göre dünyada tarım ilacı kullanımı

## 2.3. Pestisit Kullanımının Dezavantajları

Aşırı ve bilinçsiz kullanım sonucu pestisitler çevre kirlenmesi ve insan sağlığı açısından çeşitli sorunların ortaya çıkmasına yol açmıştır [17]. Bu sorunlar aşağıda sıralanmıştır:

- Pestisitler kanser, doğum anormallikleri, sinir sistemi zararları ve uzun dönemde oluşan yan etkilere neden olurlar,
- Pestisitler ve parçalanma ürünleri toksik maddeleri içerirler,
- Parçalanma ürünlerinden bazıları ana pestisitten daha toksik ve kalıcıdır,
- Uygulanan pestisite ve uygulama koşullarına bağlı olarak, çevre kirliliğine neden olmaktadır,
- Aşırı buharlaşabilenler soluduğumuz havayı kirletmektedir,
- Aşırı kullanımı organizmalarda ilaca karşı direnç oluşturmakta, pestisit uygulaması başarısız olmaktadır,
- Hedef alınan ve alınmayan zararlıların doğal düşmanlarını ve faydalı organizmaları da öldürerek yeni salgınlar oluşturmaktadır [12,16].

#### **2.4. Kalıntı Problemi ve Zehirlenmeler**

Pestisitler öneriler doğrultusunda kullanılmadığı zaman kalıntıları ile insan sağlığı ve çevrede olumsuz etkilere yol açmaktadır. Bu kalıntılar, tarım ürünü dış pazarını ve iç tüketimi de olumsuz etkilemektedir. Ayrıca üretim, formülasyon, hazırlama, taşıma, yükleme ve uygulama sırasında deri ve solunum yoluyla maruz kalma (akut zehirlenme) şeklinde mesleki zehirlenmelere sebep olabilirler. Genellikle organik fosforlar ve karbamatlılar bu tip zehirlenmeye neden olurlar. Bunlar vücutta kolinesteraz enzimini engelleyerek asetilkolin birikimine yol açarlar. Kaza ile meydana gelen zehirlenmelerde pestisitlerin yaprak ve topraktaki kalıntıları veya onların toksik dönüşüm ürünleriyle temas sonucu hastalıklar meydana gelebilmektedir. Aşırı dozlarda alınmadıkça organik klorlu pestisitlerin insanlara akut toksik etkileri nadir görülür. Bu bileşikler daha çok kronik zehirlenmelere neden olmakta, sinir sistemini etkilemekte ve karaciğere zarar vermektedirler. Son yıllarda ilaçların besin maddelerindeki kalıntılarının insanlar için kronik toksisitesi iki şekilde ele alınmaktadır:

- a. Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable Daily Intake-ADI): Bir kişinin bir günde alabileceği kabul edilebilir günlük ilaç miktarını mg/kg olarak ifade eden değerdir.
- b. Maksimum kalıntı limitleri (Maximum Residue Limits-MRL): Gıda maddelerinde bulunmasına izin verilen en fazla ilaç miktarını (mg/kg) ifade eden değerdir.

Pestisitlerin kalıntı yoluyla kronik toksisiteyi yanında bazılarının insanlarda mutajenik, teratojenik ve kanserojenik etkilerinin de olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla

saptanmıştır. Pestisit uygulamasıyla tarımsal üründe kalabilecek kalıntı miktarı çeşitli faktörlere bağlıdır. Bunlar [12];

- a) Uygulamanın yapıldığı bitki çeşidi,
- b) Etkili maddenin kimyasal yapısı ve özellikleri,
- c) Kullanım dozu ve tekrarı,
- d) Etkili maddenin formülasyonu,
- e) Uygulama ile hasat arasındaki geçen süre,
- f) Uygulama anında/sonunda çevre ve iklim koşulları,
- g) Hasattan tüketime kadar uygulanan işlemler,
- h) İlacın formülasyonu ve uygulama dozunun fazla olması,
- i) Killi toprak tipinin pestisitlerin birikimini artırması,
- j) Toprak sıcaklığı,
- k) Toprağın işlenmesi,
- l) Bitki örtüsü,
- m) Toprağın mikroorganizma içeriğidir.

## **2.5. Hedef Olmayan Organizmalar Üzerine Etkisi**

Pestisit uygulamasının %0.015- 6.0'sı hedef alınan canlı üzerine ulaşmakta, geri kalan %94-99.9'luk kısım ise ekosistemde hedef olmayan organizmalara ve toprağa ulaşmakta ya da çevredeki doğal ekosistemlere sürüklenme ve akıntı nedeniyle kimyasal kirleticiler olarak sulara karışmaktadır [18]. Hemen bütün insektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler. Zararlı etkilerin şiddeti, insektisit ve formülasyonun tipine, uygulama şekline ve tarımsal arazinin ve üretimin tipine bağlı olarak değişmektedir. Bilinen yan etkiler şunlardır:

- Arılar, kuşlar ve balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler,
- Kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalması,
- Hedef olmayan organizmalarda dayanıklılık oluşması sonucu insanlara hastalık taşıyan böcek ve parazitlerin kontrolden çıkması,
- Ekosistemin yapısının ve türlerin sayılarının değişmesi gibi uzun dönemli etkiler [12].

## 2.6. İnsanlar Üzerine Etkileri

Endokrin bozucular (ED), endokrin sistemi ve ilişkili tüm sistemlerin çalışmasını etkileyen kimyasal maddelerdir. ED'lar hayatımızda sık kullandığımız deterjanlar, plastikler, pestisitler, boyalar ve mesleki maruziyeti yüksek endüstriyel kimyasallarda bulunurlar.

Pestisitler ve diğer endokrin bozucu kimyasal maddeler, endokrin sistem tarafından sentezlenen endojen kimyasalların aktivitelerini bir şekilde taklit ettikleri, blokladıkları ya da değiştirdikleri için özel ilgi konusudurlar. Diğer birçok organın yanında, özellikle üriner sistemi ve tiroid bezlerini etkilemektedirler.

Bu kimyasallar, çevrede veya vücutta birikebilir. Bazıları üreme sistemini etkilerken, bazıları ergenlik döneminde gelişim bozukluklarına neden olur. Oligospermi, sperm yapısında anormallik, testiküler steroidegenezde bozukluklar, testiküler atrofi, uterus boyutlarında artış ve erken ergenlik örnek gösterilebilir.

Endokrin bozucu kimyasallar östrojen ve androjen reseptörleri ile reaksiyona girip, endojen hormonların agonist ya da antagonistleri olarak etki gösterebilirler. Son on yılda reproduktif organ anomalileri, testiküler kanser, erkek doğum oranlarında azalma ve semen kalitesinde düşme rapor eden birçok çalışma yayınlanmıştır.

Çizelge 2.1. Endokrin bozucuların üreme sistemi üzerine etki mekanizmaları

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Östrojen Reseptörlerini Uyararak Etkileyenler: Bisfenol A ve B, Nonilfenol, Oktilfenol, Dietilstilbestrol, Metoksiklor, Klordekan, Genistein, DDT ve Metabolitleri .</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Androjen Reseptörlerini inhibe Ederek Etkileyenler: Vinklozin, Flutamid, DDT ve Metabolitleri, Metoksiklor, Fenitroton, Prosimidon, Linuron .</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Steroid Hormon Sentezini inhibe Edenler: Fitalat, Trifeniltin, Fenarimol, Fadrozol, Ketokonazol, Finasterid, Endosulfan</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Apoptozise Neden Olanlar: Deltametrin, Oksifenol, 1,2-dibromo- 3kloropropan.</li> </ul>

Pestisitlerin insanlarda toksik olmaları nedeniyle mücadelede çalışan herkesin bunların kullanımısirasında meydana gelebilecek potansiyel zararlardan sakınmaları gerekir. İnsanların pestisitlere maruz kalması mesleki zehirlenmeler veya kaza ile meydana gelebilmektedir. Her iki tür zehirlenmenin ana nedenleri:

- Halkın bu konuda yetersiz eğitime sahip olması ve pestisitlerin toksisite potansiyellerinin bilinmemesi,
- Uygun olmayan koşullarda depolama,
- Kaza ile saçılma sonucu gıdalara bulaşması,
- Dikkatsiz yükleme ve taşıma,
- Yıkanmamış pestisit kaplarının kullanımı,
- Genel bakım ve atık değerlendirme işlemleri olarak sayılabilir [18].

## 2.7. Çevre Üzerine Etkileri

Tarımsal alanlarda, bahçelere veya ormanlara uygulanan pestisitler havaya, suya ve toprağa oradan da bu ortamlarda yaşayan canlılara geçmekte ve dönüşüme uğramaktadırlar. Pestisitlerin hareketini, iklim ve tarımsal koşullar, pestisit kimyasal yapısı, formulasyon tipi, fiziksel özellikleri ve uygulama şekli etkilemektedir.

İlaç kalıntıları, askıdaki maddelere ve suya bağlanarak dip sedimanlarında toplanmakta ya da canlılar tarafından adsorblanmaktadır [19]. Sularda pestisitlerin ağır kontaminasyonları oksijen kıtlığına, dolayısıyla da zehirlenmelere öncülük etmekte ve en nihai olarak da balık ve diğer canlıların kitlesel ölümlerine yol açmaktadır.

Tarım ilacı kullanmadan üretim yapılması %65 oranında ürün kaybına sebep olmaktadır. Bu nedenle dünyada birim alandaki verim yüzdesini artırmak amacıyla tarımda pestisitlerin kullanımı zorunlu hale gelmiştir [20]. Tarımsal açıdan büyük fayda sağlamalarının yanı sıra, canlılar için toksik olan bu maddeler çevreye yayılarak yüksek oranda çevre kirliliği problemi oluşturmakta ve çevre kirleticileri arasında sayılmaktadırlar [21].

Toprağa ulaşan pestisitler, güneş ışığının etkisiyle fotokimyasal degradesyona uğramakta; toprak mikroorganizmaları, bitki ve diğer organizmaların etkisiyle de biyolojik

degradasyona uğramakta; toprak katı maddeleri (organik madde ve kil) tarafından adsorbe ve desorbe olmakta veya kimyasal degradasyona uğramaktadır [22]. Toprak içerisine geçmiş pestisitler, kapiller su aracılığıyla toprak yüzeyine taşınabilmekte ve havaya karışabilmektedir. Toprakta pestisitlerin tutulması ile biyolojik alımı engellenmekte ve çeşitli yollarla degradasyonu ya toksik özelliği kaybolmakta ya da toksik metabolitlere dönüşebilmektedir.

Zooplanktonların, kalıcı lipofilik kimyasalları, özellikle organik klor içerikli pestisitleri, kendi çevrelerinde bulunandan daha fazla biriktirdikleri bilinmektedir [23]. Birikimin, ya difüzyonla sudan direk alım vasıtasıyla [24, 25, 26] ya da kontamine olmuş organik maddenin yenmesi yoluyla [27, 28, 29] olduğu bilinmektedir. Suda çözünürlüğü düşük olan ve yüksek stabiliteye sahip olan pestisitlerin yağ dokusunda birikme eğiliminde oldukları belirtilmiştir [30].

### **2.7.1. Pestisitlerin yeraltı sularına bulaşması**

Pestisitler ya doğal yollarla ya yağmur suyu ya da sulama yolu ile havzalara ve su birikintilerine girebilmektedirler [31, 32]. Toprak ve bitki uygulamalarından sonra toprağın yüzeyinde kalan pestisitler, yağmur suları ile yüzey akışı şeklinde veya toprak içerisinde aşağı doğru yıkanmak kaydıyla, taban suyu ve diğer su kaynaklarına ulaşabilmektedirler. Bitki örtüsü, eğim, formülasyon ve yağış miktarı gibi faktörler pestisitlerin taşınmasını etkileyen faktörlerdir. Toprak tipine bağlı olarak taşınan pestisitler, sulara balık ve sucul omurgasızların ölmesine, bu organizmalardaki pestisit kalıntısının insanların besin zincirine girmesi ve kontamine olmuş suların içilmesi yoluyla da kronik toksisitenin oluşmasına neden olmaktadır.

Birçok toprak çeşidinde geniş deliklerin bulunması (çatlaklar ve yarıklar, solucan ve kurt delikleri, kök kanalları) yeraltı suyuna süzülen pestisit tehlikesini arttırmaktadır. Bu delikler yoluyla, su ve çözünen maddeler toprak matriksinin çoğunu atlayarak hızlıca alt toprağa ve yeraltı suyuna ulaşmaktadır [33].

Yüzeydeki suların süzülmesi, yeraltı sularının kontamine olmasına neden olmaktadır. Su kuvvetinde meydana gelen yükselme ve alçalmalar; yüzey suyunun yeraltı sularını doldurmasına veya yeraltı suyuyla birleşmesine neden olabilmektedir [34].

### 2.7.2. Pestisitlerin yüzey sularına bulaşması

Bir ilacın uygulanması sırasında ilacın yüzey sularına bulaşmasını engellemek için gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir. Kimyasal yüzey sularına iki şekilde ulaşabilmektedir;

1. Kısa süreli; sürüklenme (drift), yüzeyden akma, yüksek doz
2. Uzun süreli; ilaç ve ilacın kullanıldığı kapların akarsu ve kanalizasyonlara dökülmesi veya havada bulunan ilaç kalıntılarının yüzey sularına bulaşması yolu ile.

Pestisitlerin yüzey sularına bulaşma riskleri coğrafi şartlara, iklime, ilaçlama tekniğine göre ve meteorolojik koşullara göre değişebilmektedir. Hollanda ve Almanya “Sürüklenme Modeli” olarak geliştirdikleri bir analiz modelini kullanmaktadırlar. Bu modelde analiz sonuçları doğrultusunda ilaçların, yüzey sularına bulaşma riski ihmal edilebilmekle birlikte; düşük, orta ve yüksek riskli olmak üzere sınıflandırılabilir [35].

### 2.8. Gıdaların Kontaminasyonu

Bitkinin doğrudan yolla veya toprakta kalan pestisiti kendi bünyesine alması ve bu bitkilerin insan gıdası veya hayvan yemi olarak kullanılması sonucunda pestisitler insanların gıda zincirine girmektedir. Kimyasal mücadele, belirtilen riskler nedeniyle titizlikle yapılması gereken bir iştir. Bu riskleri minimuma indirmek için uygulama sırasında gerekli her türlü önlem alınmalıdır [12].

Pestisitlerin uygulanmasından sonra bütün işlemler toprak-bitki sisteminde cereyan etmektedir. Pestisitlerin metabolizmasını ve yaprağın pestisit alımını; fizikokimyasal durum, formülasyon, damla büyüklüğü ve uygulama tekniği, yağış ve nisbi nem, sıcaklık, güneşlenme, bitki çeşidi ve fizyolojik farklılıkları, stoma, yaprak alt/üst yüzeylerinin tüylülük ve mumluluk durumları ve pestisit uygulama zamanı gibi faktörler etkiler.

Bitkideki olaylar şunlardır; (i) bitki tarafından alınan ve bitki öz suyunda çözünen pestisit ksilem doku ile aşağıdan yukarı, floem ile yukarıdan aşağı taşınabilmektedirler, (ii) biyolojik olarak taşınan pestisit bitkide birikmekte ve metabolize olmaktadır, (iii) bu metabolitler de bitki bünyesinde taşınmaktadır, (iv) vejetasyon periyodu süresince ilaçlama yapılmısa da önceki yıllarda yapılan ilaçlamalardan toprakta biriken kalıntılardan dolayı bitkide pestisit kalıntısı bulunabilir [12].

## 2.9. Pestisitlerin Güvenli ve Etkili Uygulama Koşulları

İnsan ve çevre sağlığı yönünden tarım alanında kullanılan ilaçların olumsuz etkilerine karşı değişik önlemler alınmalıdır [15]. Pestisitlerin çevre ve kalıntı açısından en uygun kullanım koşulları ve dikkat edilmesi gereken noktalar aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

a) Ülkemiz insanının gıda güvenirliliğinin sağlanması ve çevreyi ve dış ticaretimizi koruyabilmek amacıyla pestisit kullanımı çok bilinçli ve kontrollü yapılmalıdır. AB ve ABD’de çevreyi ve sağlığı olabildiğince az etkileme potansiyelindeki düşük riskli ya da çevre dostu pestisitlere öncelik verilmektedir.

b) ABD Çevre Koruma Örgütü (US EPA)’ne göre insan sağlığına düşük etkili, hedef dışı organizmalara düşük zehirli, yeraltı sularını kirletme potansiyeli düşük olanlar, zararlı organizmalarda dayanıklılık riski düşük olan pestisitler seçilmelidir.

c) Çevre ve insanı tek bir sistem olarak gören sürdürülebilir tarım uygulanmalıdır. Bu amaçla Entegre Ürün Yönetimi (Integrated Crop Management) ve Entegre Mücadele Yönetimi (Integrated Pest Management-IPM) sistemi geliştirilmiştir. IPM; kültürel, fiziksel, mekanik, biyolojik, biyoteknolojik mücadele ve pestisit uygulamalarının, zararlıyı kontrol edebilecek uygun metotla, en ekonomik yolla, çevre ve insana en az zararla, koordineli olarak uygulanmasıdır.

d) Kimyasal mücadele IPM görüşü içerisinde çevre ve insan sağlığı açısından olabildiğince düşük riskli pestisitlerle yapılmalıdır [17].

e) Hedef alınan pestin biyolojisine göre en etkin ilaçlama zamanı seçilmelidir.

f) En etkin metot, azami koruma önlemleri alınarak uygulanmalıdır.

g) İlk etkisi kuvvetli, kalıcılığı daha kısa süren pestisit seçilmelidir.

h) Son ilaçlama ile hasat arasındaki süreye dikkat edilmelidir.

ı) Uygulama aletinin bakım ve kalibrasyonu yapılmalıdır.

i) Kimyasal karışım uygulama yerinde yapılmalıdır.

j) Mümkünse doğaya ve faydalı canlılara en az zarar veren ilaç seçilmelidir.

l) Önerilen dozda pestisit uygulaması yapılmalıdır.

m) Uygulama öncesi gerekli önlemler alınmalı, uygulayıcılar eğitilmelidir.

n) Ambalajı bozuk tarım ilaçları satın alınmamalı, bunlar çocuklardan, yiyecek ve içecek maddelerinden uzak güvenli yerlerde bulundurulmalıdır.

o) Uygulama uygun hava şartlarında, rüzgârsız havada ve günün serin saatlerinde yapılmalıdır.

p)Uygulama sırasında herhangi bir şey yenmemeli, içilmemeli ağza dokunulmamalı, ilaçlama sonrası elbise değiştirilip eller ve yüz bol sabunlu su ile yıkanmalıdır.

ö)Uygulamalar çocuklara yaptırılmamalı ve ilaçlama alanından diğer işçiler de uzaklaştırılmalıdır.

r)İlaçlama sırasında çiftlik hayvanları uzak tutulmalı, ilaçlanan alana belli bir süre geçmeden hayvan sokulmamalıdır. Bu amaçla, ilaçlı sahaya girişi engelleyecek uyarı levhaları asılmalıdır.

s) Kullanılan alet ve yardımcı kaplar iş bittikten sonra iyice yıkanmalı, boşalan ilaç kapları yakılarak ya da çok derinlere gömülerek imha edilmelidir.

t) Çevredeki arı yetiştiricileri uyarılmalı, kovanlar bir süre kapatılmalıdır [36].

## 2.10. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılırlar. Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma şekilleri ise kullanıldıkları zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmalardır. Kullanıldıkları zararlı gruplarına ya da hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmada; en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir.

Pestisitlerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırıldıklarında en önemlileri, organik klorlu pestisitler, fosforlular, karbamatlar, doğal ve sentetik pretroidlerdir [37, 38].

Pestisitler ayrıca sistemik ve kontakt (yüzey pestisiti) etkili olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Sistemik pestisitler bitki dokusuna nüfuz eder ve doku içinde çeşitli bölgelere taşınıp yerleşerek etki gösterirler. Böylece korumaları ve etkileri daha uzun sürer. Daha önceki yıllarda kullanılan pestisitler genellikle kontakt pestisitlerdir. Bu nedenle yağmur, rüzgar ve güneş ışığında uzun süre kalıcılıklarını koruyamadıkları için etki süreleri kısadır. Çevresel olarak kalıcı olan organoklorlu pestisitler son 30 yıldır üzerinde önemle çalışılan konulardan birisidir. Çevrede organoklorlu pestisitlerin sürekli bulunması, besinler ile suda DDT (dikloro difenil trikloroethan) ve bazı siklodienlerin kalıntısına neden olmaktadır. 1960'larda yapılan araştırmalar, organoklorlu pestisitlerden DDT'nin gıdalarda ve çevrede önemli kalıntılar bıraktığını ortaya koymuştur. DDT içeren et ve süt ürünlerinin tüketilmesi

sonucu, insan sütünde ve vücut yağında, yüksek miktarda kalıntı olduğunun saptanmasından sonra kullanımı birçok ülkede yasaklanmıştır [39].

### **2.11. Sentetik Piretroidler**

Bu grup piretroid insektisitler 40 yıldan fazladır kullanılmaktadır ve dünya çapında insektisit piyasasının %25'inden sorumludur. Sentetik piretroidler, tarımsal kullanımlarının yanında aerosol, mat, spiral ve sıvı buhar halinde sivrisinek kovucu olarak evlerimizde yaygın şekilde kullanılırlar. Doğal piretrinlerin alkol ve asit köklerinde yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir. Işığa karşı dayanıklı sentetik piretroidler sentezlenerek 1975 yılından sonra böcek kontrolünde hızla kullanılmaya başlanmıştır. Sodyum kanallarıyla etkileşime girerek periferik ve merkezi sinir sistemindeki aksonlar üzerinde sinir zehirleri olarak etki gösterirler. Temas ve mide zehiri etkilidirler. Memeli vücudunda birikmeden dışarı atılırlar. Doğada kolayca parçalanabilirler. Özellikle ergin kontrolünde kullanılmaktadırlar. DDT gibi kalıcı insektisitlerle karşılaştırıldığında, güçlü etkisi, yüksek böcek/memeli toksisite oranı, memelilerde hızlı şekilde detoksifiye olma metabolizması ve kümülatif toksisitenin yokluğu gibi bir çok avantajlara sahiptirler. Bu nedenle daha önce kullanılan birçok insektisite tercih edilmektedirler. Günümüzde yaygın olarak kullanılan sentetik piretroidler şunlardır:

1. Permetrin
2. Sipermetrin
3. Alfa-Sipermetrin
4. Sifenotrin
5. D-Fenotrin
6. Rezetmetrin
7. Siflutrin
8. Beta-Siflutrin
9. Deltametrin
10. Etofenproks [40, 41, 42]

### 2.11.1. Etofenproks

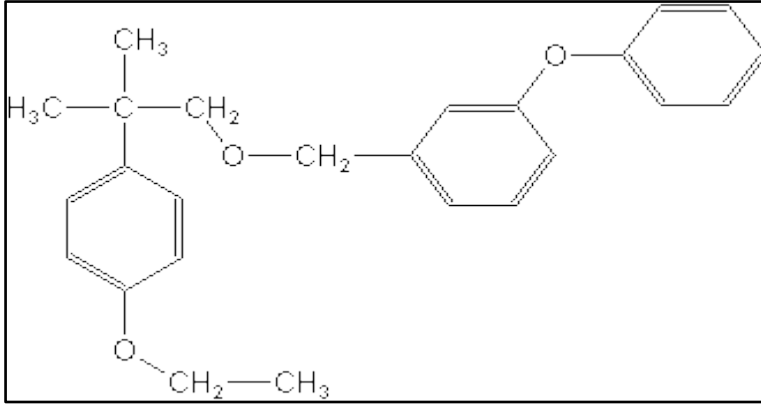
Etofenproks (2-(4-etoksifenil)2-metilpropil 3-fenoksibenzileter, Ethofenprox, Trebon, MTI-500, CAS No. 80844-07-1), bir nonester sentetik piretroittir.

Halk sağlığı ve tarımsal uygulamalarda çok miktarda ve yoğun kullanılan etofenproksun; hedef olmayan canlı balıklarda yüksek toksisite gösterdiği düşünülmektedir. Ksenobiyotiklerin balık ve omurgalı türlerinde başlıca gonadlarda, tiroitte ve adrenokortikal fonksiyonlarda endokrin toksisite göstermekte ve sonunda insan sağlığını tehdit etmektedir. Doğal hormonlardan daha düşük potensde olmalarına rağmen su ve gıda yoluyla karışım halinde insana ulaştığından önemli risk oluşturmaktadır.

Etofenproks genellikle haşereleri kontrol etmek için kullanılır. Pirinç, meyve, sebze, mısır, soya fasulyesi, çay gibi ürünlerin zararlılarına karşı geniş bir etki spektrumu vardır. Tarım arazisinde bitkilerin üzerindeki haşere türlerine 14 gün boyunca 0,03-1,2 kilogram/hektar konsantrasyonunda uygulanabilir. Etofenproks diğer pestisitlere benzer şekilde direkt olarak su ile ya da indirekt olarak yağmur suları ve yüzey suları ile vücuda alınabilir.

Etofenproks sinir sisteminde sodyum kanal fonksiyonlarını bozarak etki eder. Sucul organizmalarda akut toksisite çalışmaları bazı standart türlerle sınırlıdır.

Etofenproks için 48 saatlik LC50 değerı tropikal balık türlerinde 5 mg/L olarak saptanmıştır [24]. Etofenproks için 96. saat LC50 değerleri: Mavi solungaç gibi sucul omurgalılarda (*Lepomis macrochirus*) 13 mg/L, Gökkuşağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 2,7 mg/L, Nil tilapiasında (*Oreochromis niloticus*) 8,4 mg/L, Tilapia zilinde 5 mg/L ve Zebra balığında (*Danio rerio*) 0,079 mg/L bulunmuştur [42].



Şekil 2.3. Etofenproksun kimyasal formülü [43]

Çizelge 2.2. *In vitro* ve *in vivo* testlerde etofenproksa ait mutajenite test sonuçları [44]

Test sistemi	Çalışma tipi	Konsantrasyon aralığı ya da test dozu, klavuz ilke, saflık	Sonuç	Referans
<i>S. typhimurium</i> 5 suş	<i>In vitro</i> gen mutasyon testi	0, 0 (solvent), 200-3200 µg/plate (deney tüplerinde ±S9), OECD 471 (1981). %96.3 saflık	Negatif, ±S9 aktivasyonu	500-5-19
İnsan lenfositleri		24-h: 0 (solvent), 6, 25-50 µg/mL (±S9), 92/69/EEC B. 11'e denk, %96.3 saflık	Negatif, ±S9 aktivasyonu	500-5-21
Çin hamster V79 HGPRT hücreleri	<i>In vitro</i> sitogenetik testi; 24-h maruziyet	0 (solvent), 9,75-156 µg/mL (deney tüplerinde ±S9), 79/831/EEC, Annex V, Part B, %96.3 saflık	Negatif, ±S9 aktivasyonu	500-5-20
HeLa S3 hücreleri	<i>In vitro</i> UDS testi	0 (solvent), 9,75-156 µg/mL (-S9); 0 (solvent), 2,44-39,0 µg/mL (±S9), 79/831/EEC, Annex V, Part B, %96.3 saflık	Negatif, ±S9 aktivasyonu	500-5-23
Fare	<i>In vivo</i> mikronükleus testi; 24, 46, 72-h	24-h: 0, 80,400, 2000 mg/kg; 48-h: 0, 2000 mg/kg 92/69/EEC B. 11'e denk, %96.3 saflık	Negatif	500-5-22

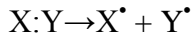
Çizelge 2. 3. Etofenproksun sucul akut toksisite sonuçları [44]

Tür	Test, klavuz ilke	Süre, saflık durumu	Sonuç	Referans
Gökkuşığı alabalığı ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	Akut toksisite, US EPA E71-1	96 h, akıntı vasıtasıyla, %95.6 saflık	LC <sub>50</sub> = 2.7 µg/L NOEC = 0.66 µg/L	500-8-05
Mavi solungaçlı aybalığı ( <i>Lepomis macrochirus</i> )	Akut toksisite, US EPA E71-2	96 h, akıntı vasıtasıyla, %95.6 saflık	LC <sub>50</sub> = 13.0 µg/L NOEC = 6,9 µg/L	500-8-07

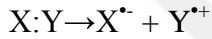
### 3. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikallerin büyük çoğunluğu *in vivo* olarak üretilir ve aminoasitler, yağ asitleri, karbonhidratlar ve nükleotitler gibi birçok biyolojik molekülü okside edebilirler [44, 45]. Serbest radikaller 3 şekilde oluşurlar;

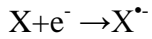
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçada ortak elektronlardan biri kalması koşuluyla oluşurlar [46, 47].



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun eksilmesi ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır [46, 47].



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar [46, 47].



Vücutta üretilen radikaller zararlı etkilerinin yanında vücut için gerekli birçok fonksiyonun gerçekleşmesinde önemli rol oynarlar. Biyokimyasal tepkimelerde moleküler oksijenin kullanılabilmesi için reaktif formlara çevrilmesi zorunludur, hücre farklılaşması, mikroorganizmalara karşı savunma, steroid yapıda çok sayıdaki bileşiğin üretimi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu çok sayıda oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri ve sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonlarında kullanılırlar [48, 49].

#### 3.1. Serbest Radikal Kaynakları

İnsanlar aerobik metabolizmaya sahip oldukları için hayatları boyunca potansiyel serbest radikal üreticisi konumundadırlar. Birçok sistem ve metabolizma üzerine etkili olan serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında ortaya çıkabildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler [48, 49].

##### 3.1.1. Endojen kaynaklar

Güçlü bir reaktif oksijen türü (ROS) kaynağı olarak solunum zinciri gösterilebilir. Oksidatif strese karşı mitokondriyal yapılar çok duyarlıdır [49]. Mitokondri aerobik solunumun bir sonucu olarak  $O_2$  tüketir,  $H_2O$  üretmek için  $O_2$ 'i birbirini izleyen

basamaklarla indirger [50]. Bu işlem süresi boyunca bazı elektronlar elektron transport zincirinden kaçarlar ve  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  veya  $H_2O_2$  üretmek için oksijen ile etkileşime girerler [51].

ROS'un diğer bir endojen kaynağını enzimler oluşturur, kendi aktivitelerinin yan ürünü olarak birçok enzim, ROS üretir.

Hüresel reaktif oksijen türlerinin endojen kaynakları nötrofiller, eosinofiller ve makrofajlardır [52, 53].

### **3.1.2. Ekzojen kaynaklar**

Reaktif oksijen türlerinin en önemli ekzojen kaynağını canlı organizmaların iyonize [39, 40] ve iyonize olmayan ışımaya maruz kalması oluşturmaktadır [55, 56, 57]. Serbest radikallerin oluşmasında iyonize ışınlar ( $x$  ve  $\gamma$  ışınları gibi) büyük rollere sahiptirler. Serbest radikallerinin oluşmasını etkileyen ışınımlar su ve oksijenin varlığına ihtiyaç duymaktadır [51]. İyonize ışımadan reaktif türler oluşur ve en fazla oluşan reaktif tür suyun radyolizinden oluşan hidroksil radikalidir [51, 54, 58].

Fotokimyasal hava kirliliğinin önemli bileşeni ozondur. Ozon biyolojik molekülleri direkt oksitleyebilir, fizyolojik pH'da su ile reaksiyona girerek hidroksil radikallerini oluşturur [59]. Bunlara ek olarak ozon; glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi anti oksidan enzimlerin inaktivasyonuna neden olur [51].

Çizelge 3. 1. Reaktif oksijen türlerinin ekzojen ve endojen kaynakları

ENDOJEN KAYNAKLAR	EKZOJEN KAYNAKLAR
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elektron transport sistemi</li> <li>• İmmun sistem aktivasyonu ve fagositoz</li> <li>• Ağır egzersiz</li> <li>• Oksidaz enzim sistemleri</li> <li>• Otooksidasyon reaksiyonları</li> <li>• Çeşitli hastalıklar (enfeksiyonlar, kalp hastalığı, mental bozukluk vb...)</li> <li>• Metabolizma (örneğin mitokondri)</li> <li>• Hücreler (örneğin nötrofiller)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hava kirliliği ve sigara</li> <li>• Çeşitli kimyasallar: Asbest, CCl<sub>4</sub></li> <li>• <math>\gamma</math>-ışınması</li> <li>• UV, ısı ve stres gibi nedenler</li> <li>• Ultrason</li> <li>• İlaçlar</li> <li>• Gıda</li> <li>• Kirletici maddeler</li> <li>• Ksenobiyotikler</li> <li>• Toksinler</li> </ul>

### 3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Özellikleri

Oksidatif fosforilasyon sayesinde aerobik organizmalar, anaerobik organizmalara oranla daha fazla enerji üretebilme yeteneğindedirler. Aerobik metabolizmanın en kötü özelliği hücre içinde ROS oluşumu için sürekli bir ortam oluşturmalarıdır [60]. Oksijenin metabolize edildiği aerobik canlılarda oksijen bulunan bir ortamda daima radikal üretimi gerçekleşir [46, 47].

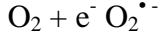
#### 3.2.1. Süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ )

Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü, devamlı olarak enzimatik mekanizmalarla önemli derecede üretilen radikallerdir ve biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler [46, 47, 61]. Oksidatif stres sonucu en çok oluşan ROS, süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) anyonudur. Hatta süperoksit ( $O_2^{\bullet-}$ ) radikali temel radikallerden sayılabilir [46, 47, 60, 61].

Süperoksit anyonu aerobik metabolizmanın normal birer yan ürünü olarak veya dış faktörlerin etkisiyle üretilir (radyasyon, ağır metaller gibi).

Hem çevresel etkenler ile hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali,  $O_2^{\bullet-}$  dir [46, 47, 60, 61].

Süperoksit radikali oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile oluşur [46, 47, 60, 61].



$O_2^{\bullet -}$ 'in en önemli kaynağı polimorfonüveli lokositlerdir (PMNL). Hücre içi  $O_2^{\bullet -}$  için temel kaynak mitokondridir. Solunum zincirindeki taşıyıcılardan devamlı olarak elektron çıkışı olur, elektronlar direkt moleküler oksijene geçerler ve onu  $O_2^{\bullet -}$ 'ye dönüştürürler. Normal hücrelerde oksijenin yaklaşık olarak %1-5'i  $O_2^{\bullet -}$ 'ye dönüştürülür.

$O_2^{\bullet -}$  oluşumuna yol açan en önemli dış etken sigara dumanı ve iyonize radyasyondur. Süperoksit anyonu zarlardan hızlı bir şekilde geçemeyeceği için tek başına reaktif bir ara ürün olamaz ve fizyolojik pH'da dismutasyona uğrar [46, 47, 61].

### 3.2.2. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Süperoksit üreten herhangi bir sistem aynı zamanda  $H_2O_2$  açığa çıkarır [59]. Hidrojen peroksit zayıf bir ROS'dur.

Bu reaksiyon süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile katalizlenir ve sonuç olarakta hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $O_2$  açığa çıkmaktadır. Bunlar daha kuvvetli reaktif oksijen türleridir.

$H_2O_2$ ; kısmen indirgenmiş metaller ( $Fe^{+2}$  veya  $Cu^{+1}$  gibi) ile Fenton reaksiyonu olarak bilinen reaksiyona girme eğilimindedir.

Bu tepkimedeki demir çok güçlü oksitleyicidir [63].Fenton reaksiyonu sonucu meydana gelen hidroksil ( $OH\bullet$ ) en reaktif ROS'tur [46, 47, 60, 61].

### 3.2.3. Hidroksil radikali ( $OH\bullet$ )

Hidroksil ( $OH\bullet$ ) en reaktif oksijen radikalidir. Piruvat dehidrogenazı inaktive eder ve direkt DNA hasarı oluşturur [47, 60].

### 3.2.4. Singlet oksijen ( $^1O_2$ )

Aslında  $^1O_2$  gerçek bir radikal değildir ve eşleşmemiş elektron içermez. Diğer reaktif oksijen türleri ile karşılaştırıldığında oldukça zararsızdır [46, 47].  $^1O_2$ , oksijen elektronlarından birinin dışarıdan enerji alması sonucu kendi dönüş yönünden ters yönde

olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi ile oluşabileceği gibi,  $O_2^{\bullet -}$ 'nin dismutasyonu ve  $H_2O_2$ 'in HOCl ile reaksiyonu sonucunda da meydana gelebilir [62].

### 3.3. Serbest Radikal Oluşumu ve Oksidatif Stres

Serbest radikaller ve oksidatif stres, insanlarda DNA hasarına yol açarak çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Serbest radikaller oldukça reaktif maddeler olup, proteinler, lipitler ve DNA gibi önemli molekülleri okside edebilme özelliğine sahiptirler. Organizmada oksidatif maddeler ile bunlara karşı oluşan antioksidan maddeler arasında bir denge söz konusudur. Eğer bu denge oksidan maddeler tarafına doğru kayarsa oksidatif stres ortaya çıkmaktadır [63, 64]. Oksidatif stres; oksidan serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır, diye tanımlanabilir.

Organizmada ROS'ların yanı sıra reaktif nitrojen türleri (RNS) de oluşmaktadır. RNS hem radikal yapıda, hem de radikal olmayan yapıda metabolitleri içerir. Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit ( $NO_2$ ) radikal yapıdakileri, nitroz asit ( $HNO_2$ ) ve  $N_2O_4$  radikal olmayan yapıdakileri oluştururken, ONOO- (peroksi nitrit) her iki terim kapsamına da girer [65].

Reaktif oksijen türleri ve RNS normal olarak sıkıca düzenlenmiş enzimlerle oluşturulur; sırasıyla nitrik oksit sentaz (NOS) ve NAD(P)H (Redükte nikotinamid adenin dinükleotid) oksidaz isoformları ilgili enzimlerdir. ROS'un aşırı üretimi, gerek mitokondrial elektron transport zincirinden gelsin, gerekse NAD(P)H'nin artmış stimülasyonu ile oluşsun, oksidatif strese yol açar. Bu da lipitler, membranlar, proteinler ve DNA gibi hücre yapılarının hasarlanmasında önemli bir mediatördür. ROS, başlıca solunum, ksenobiyotikler metabolizması, doğal uyanlarla fagositik hücrelerin aktivasyonu, biyosentez ve biyodegradasyon gibi metabolik olaylar ile oluşur [66, 67].

Sonuç olarak ROS'ların organizmalar için yüksek hasar potansiyeli vardır ve bu nedenle hızla metabolize edilmeleri önemlidir. Radikallerin yarattığı hasarın engellenmesi için antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur.

Antioksidanların eksikliğinde, serbest radikaller ve oksidatif stres, DNA'yı okside ederek hasar oluşturmakta böylece insanda çeşitli hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır.

### 3.4. Hücrede Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Mitokondriyal elektron transport zinciri, enerji üretiminde oynadığı önemli rolün yanı sıra hücrelerde en önemli ROS kaynaklarından birisi olarak yer alır [70]. Primer ROS olarak ele alınan süperoksit üretiminin ana kaynağı, mitokondride solunum zinciridir [71]. Protein sentezi arayolu (endoplazmik retikulum ve Golgi cisimi), nükleusu da içerecek şekilde, protein turnover ile birlikte, ROS ilişkili redoks durumlara şiddetle duyarlıdır. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Lizozom ve peroksizomların oluşturduğu degradasyon arayolları da aynı organellerde gelişir [72].

Ksantin oksidaz ve aldehit oksidaz gibi bazı enzimlerin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak yer alır ve pürinlerin yıkılım yolunda hipoksantinden ksantin ve ksantinden ürik asit oluşumu basamaklarında, elektron akseptörü olarak moleküler oksijenden ( $O_2$ ) daha çok  $NAD^+$  kullanır.

Bazı bileşiklerin otooksidasyonu da süperoksit radikalının bir başka kaynağıdır. Askorbik asit ve tiyoller, adrenalin bu bileşiklere örnektir [73, 74]. Diğer bir ROS kaynağı ise araşidonik asit metabolizmasıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranından araşidonik asidin serbestleşmesine yol açar. Araşidonik asidin lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri ile enzimatik oksidasyonu çeşitli serbest radikal ara ürünlerinin meydana gelmesine neden olur. Araşidonik asit metabolizması sonucu serbest radikal üretimine, enzimatik lipid peroksidasyonu denir [75, 76].

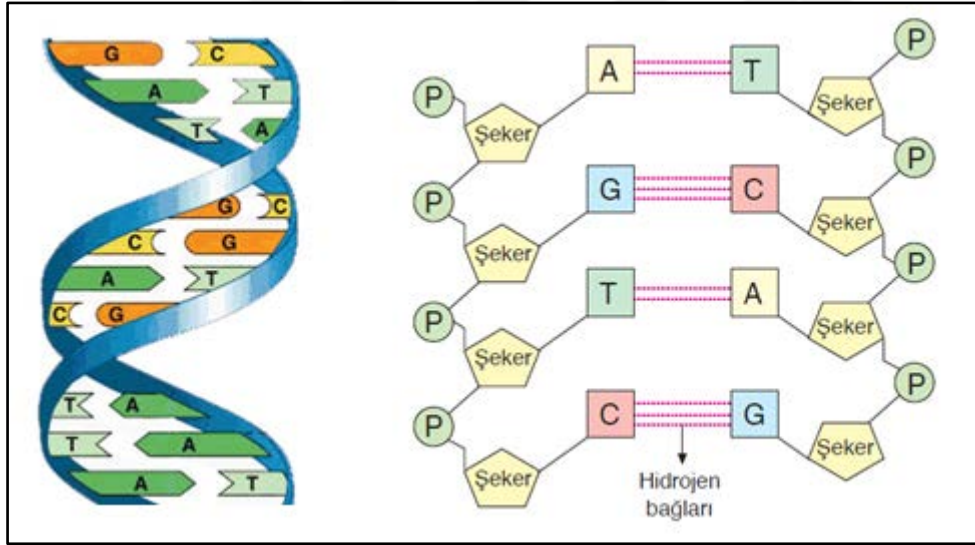
Endojen metaller, özellikle bakır ve demir, oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alırlar, ROS oluşumunda katalizör olarak etkili olurlar [77]. Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama sırasında da çeşitli serbest radikaller oluşur [78, 79].

Toksinler de ROS oluşumunu artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Bir kısım ilaçlar, endüstriyel kimyasallar (özellikle arsenik ve kurşun), bağımlılık yapan

ilaçlar, pestisidler ve bakteriyel endotoksinler bu grubu oluşturan en önemli faktörlerdir [80, 81]. Reaktif oksijen türleri lipid, protein, DNA gibi çeşitli hücrel bileşiklerde hasar oluşturur.

### 3.5. DNA ve Yapısı

Çift sarmallı bir molekül olan DNA polideoksiribonükleotiddir. Bu yapıda birbirlerine, kovalent olarak 3'-5' fosfodiester bağı ile bağlanmış birçok monodeoksiribonükleotid bulunur. Her bir DNA nükleotidinde bir pentoz şeker, bir fosfat grubu ve azot içeren bir baz bulunmaktadır. DNA zincirinin ana çatısını deoksiriboz-fosfat iskeleti oluşturur. Bazlar pürin (A, G) veya pirimidin (C, T) gruplarından oluşur. 2 polinükleotid zincire ait birbirinin tamamlayıcısı karşılıklı bazlar arasında meydana gelen hidrojen bağları sayesinde DNA'nın ikili zincir yapısı oluşur (Şekil 3.1) [82, 83].



Şekil 3.1. DNA'nın yapısı

#### 3.5.1. Reaktif oksijen türlerinin DNA üzerine etkileri

DNA, ROS aracılı hasarın en önemli hedeflerinden birisidir, ROS artışı sonucu mitokondrial DNA hasarı ve disfonksiyonu oluşur. ROS nükleotidlerde oksidatif değişikliğe sebep olarak DNA replikasyonunda defekte yol açabilir [82]. Çeşitli düzeylerde değişiklikler oluşabilir.

### 3.5.2. Oluşan DNA hasarlarının gruplandırılması

1. Baz modifikasyonları (Pürin, pirimidin bazları)
2. Şeker gruplarında modifikasyonlar
3. DNA- protein arasında çapraz bağların kurulması
4. DNA zincir kırıkları

### 3.5.3. Pürin baz modifikasyonları

DNA oksidatif hasar çalışmalarında en çok incelenmiş hasar ürünlerinin başında 8 oksoguanin gelmektedir. Guaninin 8. pozisyondan okside olması ile 7,8 dihidro-8 okso guanin (8-oksoG) oluşmaktadır. 8-oksoG genellikle DNA oksidatif stres belirleyicisi olarak kullanılabilir. 8-oksoG sitozin yerine yanlışlıkla adenin ile karşılıklı gelebilir. Eğer DNA replikasyonu öncesinde onarılmazsa 8-oksoG, GC--TA transversiyonuna yol açar. Bu nedenle 8-oksoG mutajeniktir [83, 84].

DNA'da oluşan diğer bir lezyon da 8-okso-2'deoksiguanozindir (8-oksodG). 8-oksodG, guaninin ROS aracılı 8-hidroksilasyonu ile oluşur ve oksidatif DNA hasarının iyi tanımlanmış bir belirleyicisidir. Önce 8-okso-7,8-dihidrideoksiguanozin trifosfat (8-oksodGTP) oluşur ve DNA'da baz değişikliğine yol açar ve sonra 8-okso-7,8-dihidro-2` deoksiguanozin oluşumu gerçekleşir [82]. Süperoksit dismutaz etkisiyle, mitokondrial DNA'da 8-oksodG'in biriktiği gösterilmiştir [85].

### 3.6. DNA Hasarı Tamir Mekanizmaları

DNA tamiri, genomun bütünlüğünü korumaya yönelik olarak düzenlenmiş bir savunma sistemidir [86].

DNA'da oluşan oksidatif hasar sonucu bazlarda oluşan küçük kimyasal değişimlerin tamirinden başlıca sorumlu arayol, baz eksizyon onarım yoludur (BER-base excision repair pathway) [84]. Hasarlı bazı tanıyıp uzaklaştıran DNA glikozilaz enzimidir. Bazlara spesifik birçok glikozilaz türü tanımlanmıştır. Pek çok DNA oksidatif DNA lezyonu arasında 8-oxoG, ROS tarafından en çok oluşturulan okside bazdır; 8-oxoG, DNA glikozilaz BER arayolunu harekete geçiren en önemli enzimidir. Bir diğer tamir arayolu da

nükleotid eksizyon onarım yoludur (NER) ve bazı okside DNA bazların tamirinde başvurulan bir tamir mekanizmasıdır [88, 89].

### 3.7. DNA Hasarının Tayini

Oksidatif DNA baz hasarı, prensip olarak; ya hasar ve onarım arasındaki dengeyi yansıtan DNA'da kararlı durum hasarının ölçümü, ya da spontan veya enzim katalizli hidrolizle DNA'dan serbest kalan nükleozid veya bazların izlenmesiyle olur [90]. Deoksiriboz fragmentasyonu rutin analizlerle çok zor ölçümlenebilen birçok ürün oluşturduğundan, DNA'da oksidatif hasarın saptanması amacıyla yapılan birçok araştırmada, modifiye bazlar analizlenmektedir [91]. En sık ölçümlenen oksidatif DNA baz hasar göstergesi 8-hidroksiguanin (8-OHG) ve onun deoksiriboz bağlı şekli olan 8-hidroksideoksiguanozindir (8-OHdG). Diğer ölçülebilir baz hasar ürünleri; 8-hidroksiadenin, 2-hidroksiadenin, 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin, timin glikol, 5-hidroksimetilurasil, 5,6-dihidrositozin olarak belirtilebilir [90, 92].

Oksidatif DNA hasarı tayinine bir başka yaklaşım da idrarla atılan DNA baz ürünlerinin saptanmasıdır. Bu ölçüm, vücuttaki total DNA hasarının göstergesi olarak kabul edilebilir. Oksidatif hasar ürünleri arasında en sık ölçümlenen 8-OHdG'dir [93]. Genellikle 8-OHdG'i tanıyan antikoları içeren kolonlarda idrar yoğunlaştırıldıktan sonra HPLC-ECD ile ölçülür [94].

Oksidatif baz hasarlarının ölçümüne yönelik ideal metodun saptanabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır. İdeal metoddan kasıt, 106 normal nükleozide karşılık 1 gibi düşük miktarlardaki modifikasyonları bile tespit edebilecek hassasiyete ve girişim vermesi muhtemel bileşiklerle minimal kontaminasyona girecek hassasiyete sahip metotlardır.

DNA'daki oksidatif baz hasarının izlenmesine yönelik, başlıca direkt yaklaşım ve indirekt yaklaşım olmak üzere iki yaklaşım vardır. Kullanılan her yöntemin kendine göre avantajları ve dezavantajları vardır.

Direkt yaklaşımda ilk olarak enzimatik veya kimyasal hidroliz yolu ile DNA izole edilir. Bu basamak kritik bir basamaktır, çünkü izolasyonun kendisi, oksidasyon reaksiyonlarını indükleyebilir. Sonra DNA içeriği, küçük parçalarına ayrılır ve farklı analitik metotlarla

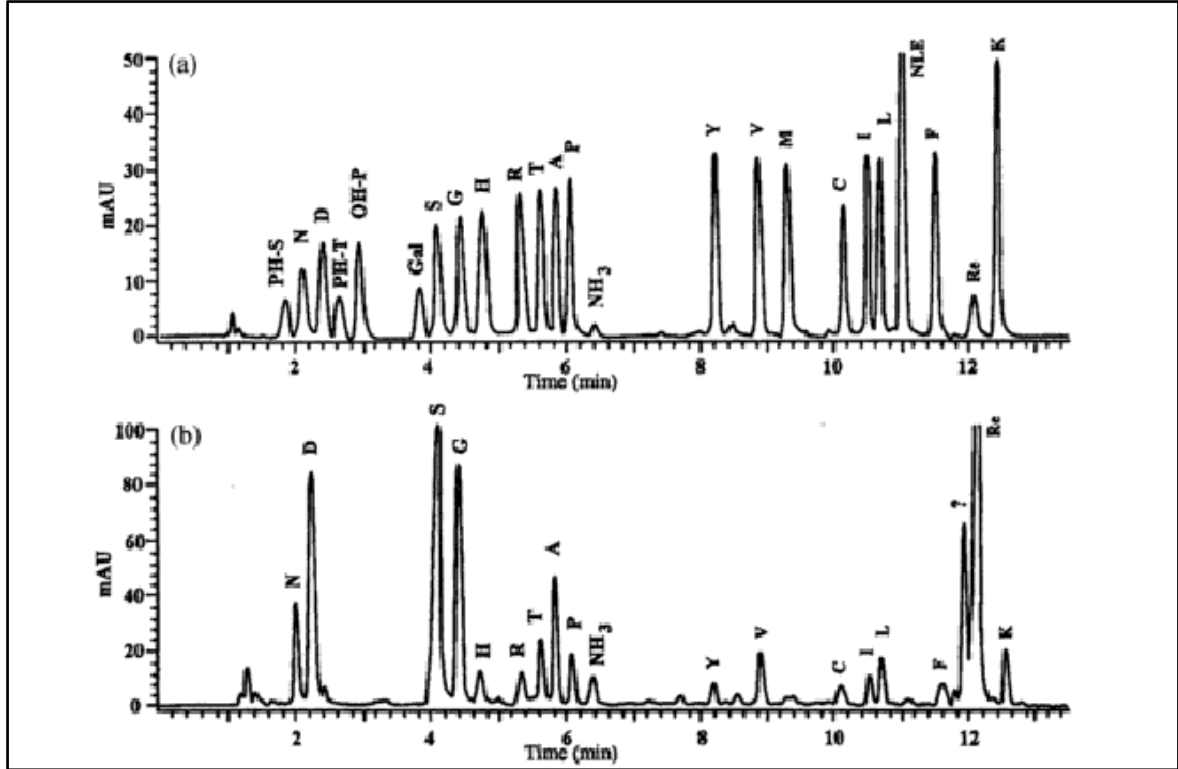
ölçüm yapılır. Oksidatif baz modifikasyonlarını ölçmekte kullanılabilen dört ana yöntem vardır [90].

1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (high pressure liquid chromatography - HPLC) - Elektrokimyasal Tarama (electrochemical detection - ECD) (HPLC+ECD) yöntemi (Direkt yaklaşıma örnek)
2. Gaz kromatografisi (gas chromatography) – Kütle Spektrometresi (mass spectrometry) (GC+MS) yöntemi (Direkt yaklaşıma örnek)
3. İzole DNA derive materyali (örn. nükleosidler veya bazlar) uygun bildirgeç ile işaretleme (Post-labeling yöntemi) (İndirekt yaklaşıma örnek)
4. Onarım endonükleazlar ile oksidatif DNA baz hasarının ölçümü (İndirekt yaklaşıma örnek)

DNA oksidatif hasarının tespitine yönelik farklı laboratuarlarda, birbirinden farklı birçok sonucun elde edilmesi nedeniyle, 1997 yılında Avrupa Birliği'nce de desteklenen Oksidatif DNA Hasarında Avrupa Standartları Komitesi (European Standarts Commitee on Oxidative DNA Damage- ESCODD) kuruldu. 27 üye laboratuarı bulunan komisyonun amacı 8-oxoG ve 8-oxodG ölçümünde kesinlik ve doğruluk sağlamak olarak bildirilmiştir. Komite tarafından yayınlanan kalite kontrol raporları, son yıllarda ölçüm sonuçlarında daha iyi veriler elde edildiğini göstermektedir [95].

### **3.7.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi + elektrokimyasal tarama (HPLC-ECD)**

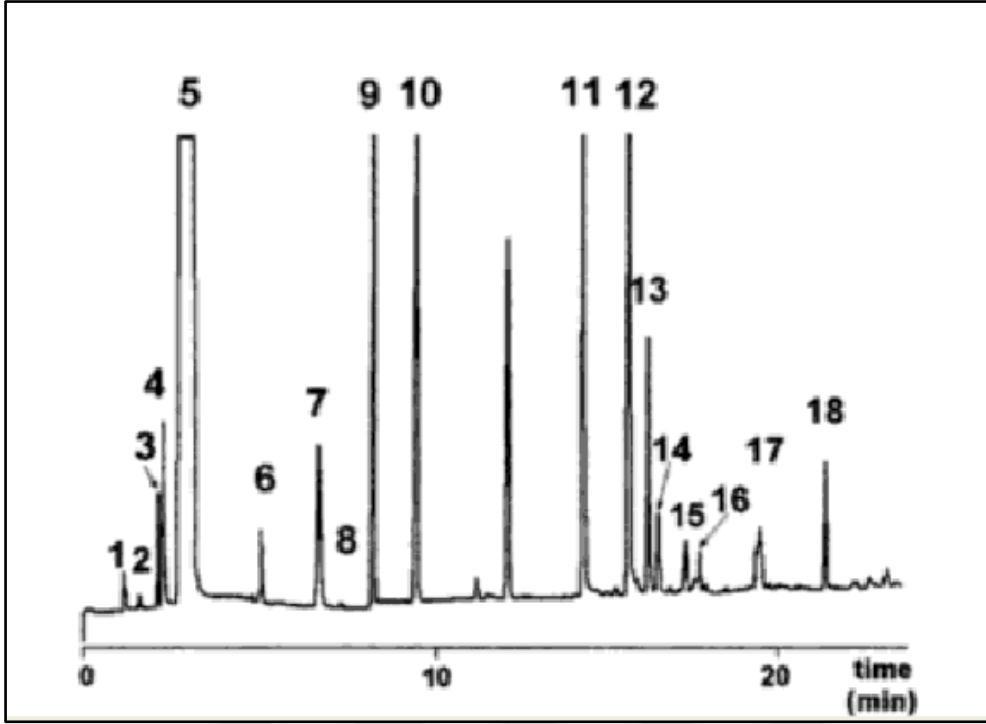
HPLC protein kökenli maddelerin tetkikinde en gelişmiş yöntemdir ve bütün aminoasitler ile ilişkili yapıları tetkik etmek mümkündür (Şekil 3.2). 8-OHdG, DNA'dan genellikle enzimatik hidroliz ile serbestleştirilir. DNA hidrolizatında bulunan 8-OHdG, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ayrılır ve elektrokimyasal dedeksiyon ile tarama yapılır [96, 97].



Şekil 3.2.HPLC yöntemi ile aminoasitlerin tetkiki [105] a) 200 pmol aminoasit standart içeriği; fosfoserin (PH-S), aspartat (N), glutamat (D), fosfotreonin (PH-T), hidroksiprolin (OH-P), galaktozamin (Gal), serin (S), glisin (G), histidin (H), arjinin (R), treonin (T), alanin (A), prolin (P), tirozin (Y), valin (V), metionin (M), sistein (C), isolizin (I), lösin (L), norlösin (NLE, 1nmol internal standart), fenilalanin (F), artmış reaktif, lizin (K) b) İnsan parmakizi analizi; su ve etanol karışımı kullanarak saat camından alınmış

### 3.7.2. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS)

Gaz kromatografisi kütle spektrometresi tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda, DNA genelde formik asitli ortamda ısıtılarak hidroliz edilir. DNA hidrolizatında bulunan hasar ürünleri gaz kromatografisi ile ayrılır ve kütle spektrometresi ile dedekte edilir. Şekil 3.3'de bir GC örneği görülmektedir [91, 98, 99].



Şekil 3.3. Gaz kromatografik analiz örneği; örnek beyaz şaraptan alınmıştır ve 18 farklı alkol türevine ait pikler görülmektedir [99]

### 3.7.3. Post-labeling yöntemi

Fosfor 32 ( $^{32}\text{P}$ ) ile işaretleme için kullanılır. DNA, önce nükleaz ve fosfodiesterazlar ile nükleotid monofosfatlara hidroliz edilir. Nükleotid monofosfatlar, polinükleotid kinaz ve radyoaktif işaretli ATP ile inkübe edilerek 5' pozisyonunda fosforillenerek işaretlenirler. 5' pozisyonunda  $^{32}\text{P}$  ile işaretli deoksi nükleotidler, ince tabaka kromatografisi (thin-layer chromatography (TLC)) ile birbirinden ayrılır ve otoradyografi ile taranır [100, 101].

### 3.7.4. Onarım endonükleazları ile oksidatif DNA baz hasarının ölçümü

Özgün enzimlerle, DNA'yı modifiye bazların bulunduğu noktalardan kırarak yeni tek dal kırıkları oluşturulur. 8-OHdG ve diğer guanin ürünlerini tanıyan bir onarım enzimi olan FAPy glikozilaz (Fpg protein) kullanılır. Enzimatik işlemden önce ve sonra saptanan dal kırıklarının karşılaştırılması ile okside bazlar ölçülür. Dal kırıkları alkali elüsyon, comet assay (tek hücre jel elektroforezi) gibi yöntemlerle saptanır [102, 103].

### **3.8. Oksidatif Streste Histolojinin Avantaj ve Sınırları**

#### **3.8.1. Histolojinin avantajları**

Her ne kadar biyokimyasal, fizyolojik ve histolojik özelliklerin birlikte değerlendirilmesi daha uygunsa da histopatolojik bulgular ani değişimler olmadığı için daha gerçek sonuçları yansıtmaktadır [104].

Histoloji organların değerlendirilmesi ve spesifik hücre lezyon tiplerinin identifikasyonunda diğer yöntemlere göre daha hızlıdır. Yani histopatolojik bulgular subletal stres yapan etkenlere ortalama yanıt olarak belirir ve histoloji özellikle kronik çalışmalarda değişik doku ve organlarda etkinin araştırılmasında en hızlı metottur. Kısaca hiçbir teknik, histopatolojik kadar hızlı bir şekilde hasarın olduğu birçok bölgeden örnek almaya olanak tanımamaktadır [104].

Kullanılan örneğin büyüklüğü (larva ya da anaç) ne olursa olsun maddenin etkilediği hedef organ ya da dokularda homojen değişiklikler görülmektedir [104].

Histoloji saha çalışmalarında da en uygun metot olarak karşımıza çıkmaktadır. Doğada kolay yakalanamayan ya da yetiştiriciliği yapılamayan türlerde yapılan çalışmalarda canlılığın ölüm sonrası incelenmesinden dolayı histolojik analiz biyokimyasal analize göre daha avantajlıdır [105].

Diğer yöntemlerin aksine, örneklerin histolojik olarak hemen incelenmesi gerekmemektedir. Uygun saklama yöntemi (Balıklarda Bouin fiksatif ve % 10'luk nötral formalin önerilmektedir.) kullanılarak inceleme daha sonra gerçekleştirip tüm organ sistemleri değerlendirebilmektedir [105].

Biyokimyasal olarak değerlendirilemeyecek kadar küçük olan örneklerde dahi histoloji kolaylıkla kullanılabilir. Yumurta ve larvaların gözlenmesinde de önemlidir [104].

#### **3.8.2. Histolojinin sınırları**

Türün normal histolojik yapısı önceden bilinmiyorsa, histopatolojik deneylerde hata olabilmektedir [104].

Histopatolojik çalışmanın gerçekleştirilmesinde canlı örneğin öldürülmesi gerekmektedir [105].



## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın deney aşaması Ağustos 2014-Aralık 2014 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi laboratuvarlarında, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarlarında ve Patoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada belli konsantrasyonlarda etofenproksa maruz bırakılmış balıklarda farklı grupların histopatolojik değişimlerini ve DNA hasarının göstergesi olan 8-OHdG düzeyini belirlemeyi amaçladık.

Çalışmada Orta Doğu Teknik Üniversitesinden sağlanan 3- 4,5 cm boylarındaki erkek ve dişi zebra balıkları kullanılmıştır.

### 4.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Balıklarda doku ve DNA hasarı oluşturmak için 1.02 g etofenproks 100 mL Dimetil sülfoksit (DMSO) (Stok1 solüsyonu) içinde çözülmüş, bundan 1mL alınıp 99 mL DMSO (Stok2 solüsyonu) ile seyreltilerek etofenproks 96. saat LC50 değeri 1/10 (8 ug / L) ve 1/100 (0.8 ug / L) oranlarında, zebra balıklarına 48 ve 96 saat süre ile uygulanmıştır.

Çalışmamız 8 grup olarak planlanmış ve her grupta 14 adet olmak üzere toplamda 112 adet zebra balığı kullanılmıştır. Grupların dağılımı aşağıdaki şekilde olmuştur:

*Grup 1 Kontrol 48. Saat (K-48):* 1. akvaryumdaki balıklar standart şartlarda izlenip, 48. saatin sonunda örnekleme yapılmıştır.

*Grup 2 Kontrol 96. Saat (K-96):* 1. akvaryumdaki balıklar standart şartlarda izlenip, 96. saatin sonunda örnekleme yapılmıştır.

*Grup 3 DMSO 48. Saat (DMSO-48):* 780 µL DMSO eklenen 2. akvaryumdaki balıklardan 48. saatin sonunda örnekleme yapılarak DMSO-48 grubu oluşturulmuştur.

*Grup 4 DMSO 96. Saat (DMSO-96):* 780 µL DMSO eklenen 2. akvaryumdaki balıklardan 96. saatin sonunda örnekleme yapılarak DMSO-96 grubu oluşturulmuştur.

*Grup 5 Düşük Doz 48. Saat (ETF1-48): 78 µL stok2 solüsyonu eklenen 2. akvaryumdaki zebra balıkları 48. saatin sonunda örneklenmiştir.*

*Grup 6 Düşük Doz 96. Saat (ETF1-96): 78 µL stok2 solüsyonu eklenen 3. akvaryumdaki balıklar 96. saatin sonunda örneklenmiştir.*

*Grup 7 Yüksek Doz 48. Saat (ETF2-48): 780 µL stok2 solüsyonu eklenen 4. akvaryumdaki balıklar 48. saatin sonunda örneklenmiştir.*

*Grup 8 Yüksek Doz 96. Saat (ETF2-96): 780 µL stok2 solüsyonu eklenen 5. akvaryumdaki balıklar 96. saatin sonunda örneklenmiştir.*



Resim 4.1. Akvaryum şartlarında deney hayvanlarının hazırlanması

Örnekleme yapılırken her gruptan 7 balık %10'luk tamponlu formole alınarak bir hafta tespit edilmiş ve histolojik doku takibine hazır hale getirilmiştir. Gruplardaki diğer 7 balık ise kafası ve kuyrukları koparılıp sıvı nitrojende dondurularak DNA izolasyonuna kadar -80° C de saklanmıştır.

## 4.2. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

- Otomatik doku takip cihazı (Ototeknikon)
- Doku bloklama cihazı (Leica EG1160)
- Rotary mikrotom (Leica RM2255)
- Su banyosu (Leica HI1210)
- Etüv (Nüve N500)
- Doku takip kaseti
- Doku bloklama kaseti
- Base mould
- Pens
- Bıçak ya da bistüri
- Buz kalıbı
- Kurşun kalem
- Etiket
- Temiz gazlı bez veya havlu kağıt
- Rodajlı lam
- Lamel
- Disposable mikrotom bıçağı (Feather N35HR)
- Sulu boya fırçası
- Lam taşıma sepeti
- Ependorf tüp
- Vorteks (Biosan)

## 4.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 10'luk tamponlu formol (Merck)
- Sıvı nitrojen (Merck)
- % 70, 80, 90, 95'lik ve absö etanol (Merck)
- Ksilen (Merck)
- Parafin (Leica)
- Hematoksilen (Merck)
- % 10'luk asit alkol

- HCl (Hidroklorik asit) (Merck)
- Amonyak (Merck)
- Eozin (Merck)
- DNA ekstraksiyon kiti (Mobio)
- Proteinaz K (Qiagen)
- DNA hasar kiti (Cayman)

#### 4.4. Histolojik Preparat Hazırlama

##### 4.4.1. Doku takibi

Çalışmanın doku takip aşaması kapalı sistem otomatik doku takip cihazında yapılmıştır. Doku takibi, cihazın reaksiyon haznesinde gerçekleştirilmiştir. Doku kasetleri cihazın sepetine dizilerek bu hazneye yerleştirilmiş, dokular bu haznede sabit kalmıştır. Cihazın kimyasal saklama haznesinde 10-12 takip solüsyon kabı, 3-4 parafin kabı bulunmaktadır. Cihaz otomatik olarak çizelge 4.1’de gösterilen sürede kimyasal sıvıları reaksiyon haznesine transfer ederek doku takibini gerçekleştirmiştir.

Çizelge 4. 1. Kapalı sistem doku takip cihazında doku takip uygulaması

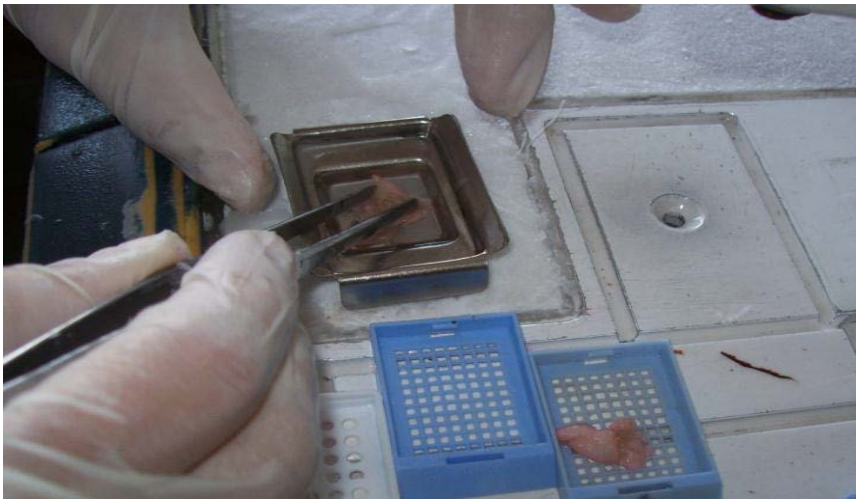
Formalin, %10	1 saat (vakum)	FİKSASYON
Alkol %70	1 saat (vakum)	DEHİDRASYON
Alkol %90	1 saat	DEHİDRASYON
Alkol %90	1 saat (vakum)	DEHİDRASYON
Alkol %95	45 dakika	DEHİDRASYON
Alkol %95	1 saat (vakum)	DEHİDRASYON
Absolu alkol	45 dakika	DEHİDRASYON
Absolu alkol	1 saat (vakum)	DEHİDRASYON
Ksilen	1 saat	ŞEFFAFLAŞTIRMA
Ksilen	1 saat (vakum)	ŞEFFAFLAŞTIRMA
Parafin	30 dakika	SERTLEŞTİRME (İNFİLTRASYON)
Parafin	1 saat	SERTLEŞTİRME (İNFİLTRASYON)
Parafin	1 saat (vakum)	SERTLEŞTİRME (İNFİLTRASYON)
Toplam Süre	12 Saat	

#### 4.4.2. Doku bloklama/Parafin gömme

Parafin bloklama işlemleri doku bloklama cihazında gerçekleştirilmiştir. Cihaz döküm işlemine hazırlanmış doku tankı, sıcak plaka ve base mould bölümlerinin sıcaklıkları ayarlanmıştır. Parafin tankı parafinle doldurularak çalışılacak olan kasetler doku depo tankı içine yerleştirilmiştir. Tank içindeki parafin seviyesi kasetleri kapatacak düzeyde ayarlanarak doku depo tankından bir kasete doku taşınıp, kaset, doku depo tankı önündeki çalışma alanına getirilmiştir. Bloklanacak dokuya uygun ebatlarda bir base mould seçilerek base mould sıcak plaka üzerine konup belli bir seviyeye kadar parafinle doldurulmuştur. Pensle/forsepsle doku kasetinden doku örneği alınmıştır.



Resim 4.2. Base moulda doku yerleştirimi



Resim 4.3. Base moulda doku yerleştirimi

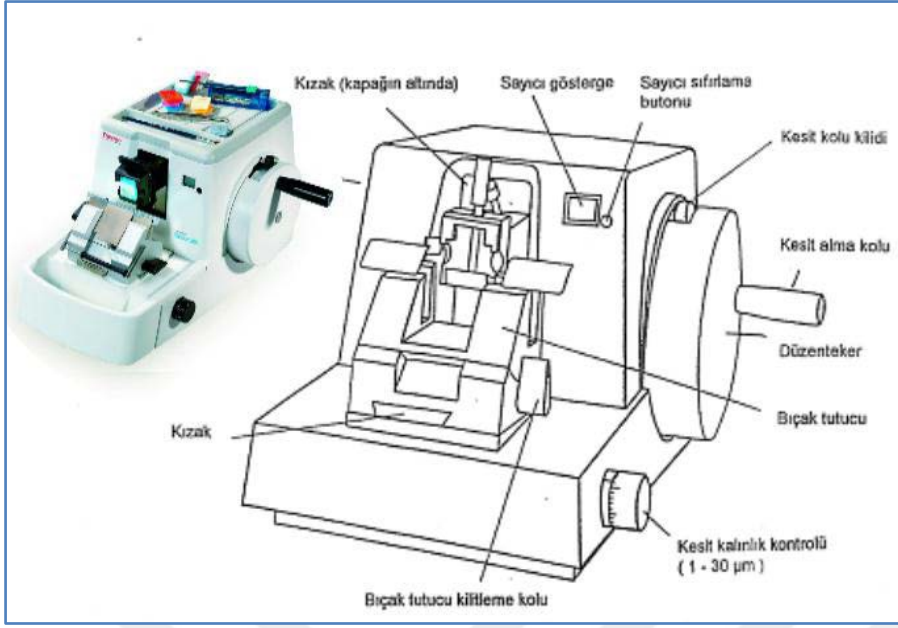
Doku örneğinin gömme yüzeyine karar verilip bu yüzey üzerine doku base moulda yerleştirilip base mould sıcak plakadan soğuk plakaya kaydırılmıştır. İçindeki dokuya pens/forsepsle pozisyon verilmiş parafinin biraz katılması için birkaç saniye beklenmiştir. Base mouldu sıcak plakanın üzerine kaydırılarak blok numarası ve kodu yazılmış kaset base mould üstüne yerleştirilmiştir. Base mould parafinle doldurulmuş base mould hızlıca soğuması için soğuk plakanın arkasına kaydırılıp bu alanda blokların katılması beklenmiştir. Katılmış blok kasetinden base mould ayrılmıştır.



Resim 4.4. Doku gömme cihazı

#### 4.4.3. Kesit alma

Işık mikroskopunda incelenecek preparatların hazırlanması için doku bloklarından 4 mikron kalınlıkta doku kesitleri yapılmıştır. Bu amaçla, parafin bloklardan ince doku kesitleri yapabilen rotary mikrotom denilen cihaz kullanılmıştır.



Resim 4.5. Rotary mikrotom ve bölümleri

Bloklar soğuk ortamdan buz kalıpları üzerine konularak kesit masasına getirilmiştir. Cihazın tüm kilitleme kolları kapatılıp bıçak yatağına disposable bıçak yerleştirilmiş, bıçak, bıçak sıkma koluyla sıkıştırılmıştır.



Resim 4.6. Disposable bıçak takılması



Resim 4.7. Disposable bıçağın sıkıştırılması

Bloklar, mikrotomun blok tutucusuna yerleştirilerek blok tutucuda oynamayacak şekilde sıkıştırılmıştır.



Resim 4.8. Blok tutucuya blok yerleştirilmesi

Mikrotom ayarı 25 mikrona getirilerek dokunun tüm katmanları (deri, deri altı dokusu gözükecek şekilde) kesitte gözükecek en geniş yüzeyi elde edinceye kadar dokuya girilmiştir. Kesit kalınlık kontrol düğmesi ile mikron ayarı 4 mikron yapılarak, şerit şeklinde elde edilen kesitler 50°C'deki su banyosuna sulu boya fırçası ile atılarak açılması sağlanmıştır.



Resim 4.9. Doku kesiti



Resim 4.10. Doku kesitinin sıcak su banyosuna atımı

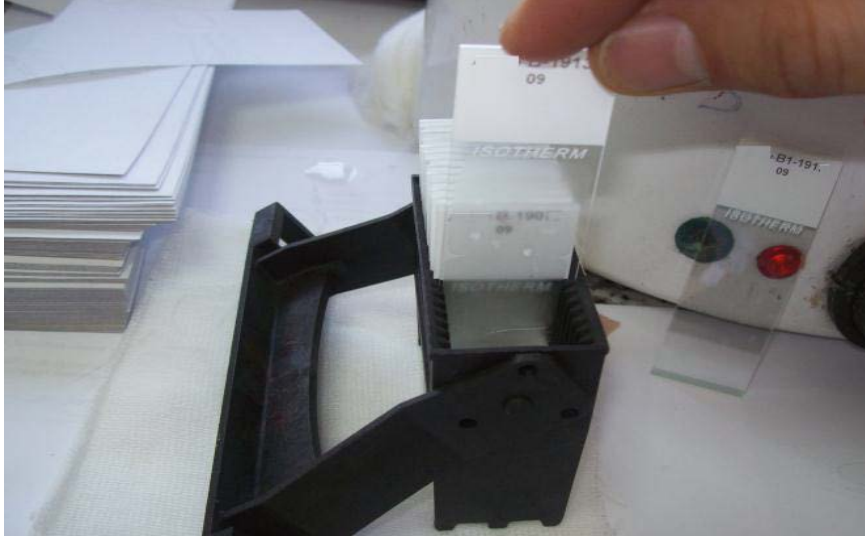
#### 4.4.4. Dokuları lama alma

Lam, dik şekilde sıcak su banyosuna daldırılarak su üzerinde yüzen doku şeridine yaklaştırılarak doku kesiti alınmış yüzü su yüzeyi ile dar açı yapacak şekilde sudan çıkarılarak doku lama çekilmiştir.



Resim 4.11. Lama doku alımı

Doku kesiti alınan lamlar, lam sepetine dik olarak yerleştirilmiştir.



Resim 4.12. Doku kesiti alınmış lamın doku taşıma sepetine yerleştirilmesi

Doku kesitleri lama daha iyi tutunması ve kuruması için etüve (80°C) kaldırılmıştır. Ayrıca etüve doku kesitlerine infiltre olmuş parafinlerin sıcaklık etkisiyle erimeye başlamasıyla deparafinizasyon (dokudan parafinin giderilmesi) işlemine de başlanılmıştır.

#### 4.4.5. Deparafinizasyon

Doku kesitleri çizelge 4.2.'deki sürelerde etüve ve aşağıdaki solüsyonlarda bekletilmiştir. Bu işlem sonunda lamdaki ve dokulardaki parafinler ksilenle uzaklaştırılmış, dokular aynı zamanda şeffaflaştırılarak dokulara kaybettiği su tekrar kazandırılmıştır.

Çizelge 4. 2. Deparafinizasyon uygulaması

DEPARAFİNİZASYON		
80°C Etüv	45 dakika	Doku kesitlerinin kurutulması, lama tutunmasını artırma ve parafinin eritilmesi
1. Ksilen	15 dakika	Dokudan parafinin uzaklaştırılması ve şeffaflaştırma
2. Ksilen	15 dakika	
% 96 Alkol	15 dakika	Hidratasyon
% 96 Alkol	15 dakika	
% 96 Alkol	15 dakika	
Distile su	10 dakika	

#### 4.4.6. Hematoksilen-eosin (HE) boyama

Boyama işlemi kapalı sistem tam otomatik boyama cihazında gerçekleştirilmiştir. Boya işlem basamaklarında bulunan boya ve solüsyonlar, belirtilen sıraya göre çizelge 4.3'te belirtildiği şekilde cihaz tarafından uygulanmıştır.

Çizelge 4. 3. Doku preparatlarının HE boyama–kapatma/montaj uygulama aşamaları

Hematoksilen	4 dk		HE BOYA UYGULAMASI
Çeşme suyu	2 dk (yıkama)		
Asit alkol (%80 alkolde %1 HCl çözeltisi)	5 sn	Diferansiyasyon (Fazla boyanın uzaklaştırılması)	
Çeşme suyu	1.5 dk (yıkama)	Suyla diferansiyasyonun durudurulması	
Amonyaklı su (%1 Amonyak çözeltisi)	30 saniye	Bazık ortamda mavileştirme	
Çeşme suyu	1.5 dk (yıkama)		
Eosin	1 dk		
Çeşme suyu	1 dk		
% 70 Alkol	1 dk	DEHİDRASYON	
% 96 Alkol	1 dk		
% 100 Alkol	1 dk		
Kurutma			
Ksilol			
Kapatma/Montaj			

Kapatma işleminde sırayla bütün lamlardaki kesitlerin üzerine yeterli miktarda kapatma maddesi damlatılarak uygun boyutlu lamel bırakılmıştır.

#### 4.5. DNA Ekstraksiyonu

Sıvı nitrojende dondurularak -80°C'de saklanan balık örnekleri eritilerek Mobio marka DNA ekstraksiyon ticari kiti ile DNA ekstraksiyonları yapılmıştır.

Doku örnekleri bistüri ile ezilmiş örneklerden 0,25 gram boncuklu tüplere aktararak üzerlerine 700 µL TD1 tamponu ve 20 µL proteinaz K eklenmiştir. 10 dakika süreyle

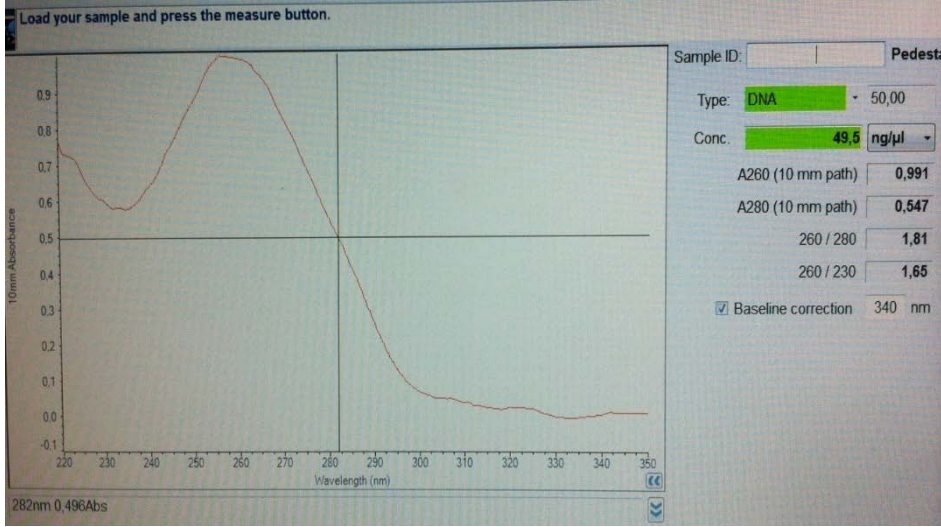
maksimum hızda vortekslenmiştir. Tüpler oda ısısında 10000 g.de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı kolon tüplere aktarılmış, bunun üzerine 400 µL TD2 tamponu eklenmiştir. 10000 g.de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Altındaki toplama tüpü atılıp kolon tüpler temiz ependorf tüplerin içine konulmuştur. Kolon tüplere 50 µL TD3 tamponu eklenmiş ve 10000 g.de 1 da santrifüj edilmiştir. Kolon tüpler atılarak altındaki ependorf tüplerde toplanan DNA miktarları nanodropta (spektrofotometre gibi) ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları çizelge 4.4 ve 4.5’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. 48. saat balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları

Örnek No	Kontrol (ng/µL)	DMSO (ng/µL)	ETF-Düşük Doz (ng/µL)	ETF-Yüksek Doz (ng/µL)
1	51	87,4	107,1	38,1
2	59,2	54,1	92,7	113,2
3	47,1	56,1	108,7	37,2
4	38,5	49,5	42,5	159,1
5		62,4	83,9	21,5
6		22,7	64	92,4
7		85	126	43,8

Çizelge 4.5. 96. saat balık örneklerinin nanodropta ölçülen DNA miktarları

Örnek No	Kontrol (ng/µL)	DMSO (ng/µL)	ETF-Düşük Doz (ng/µL)	ETF-Yüksek Doz (ng/µL)
1	32	44,6	81,8	16,2
2	11,6		25,2	60
3	12,2		72,6	8,6
4	22,7		13,6	55,6
5	32,3		55,4	11,7
6	44,3		16,9	59,5
7	12,6		63	8,6



Resim 4.13. Nanodrop DNA ölçüm grafiği

#### 4.6. DNA Hidrolizi

50 µL elüsyon solüsyonu içindeki DNA örnekleri 3 dakika 95 °C'deki ısıtıcı blokta bekletilip buz üzerinde soğutularak tek sarmallı DNA'lar elde edilmiştir. DNA örneklerinin üzerine 100 µL 2 µmol/L DFAM, 100 µL 20 µmol/L asetat solüsyonu (pH=5) eklenmiş ve çözelti DNA içeriği için 260 nm de spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Sonrasında 20 ile 500 µg DNA, 20 mmol/L asetat tamponu (pH=5) eklenmiş ve 65 °C'de 10 dakika hazırlanan 4 µL-3,3 mg/mL nükleaz P1 süspansiyonu ile inkübe edilerek, nükleotidlere hidrolize edilmiştir. 20 µL, 1 mol/L Tris-HCL tamponu (pH=8.5) karışıma eklenmiş, 4µL, 1 U/L alkalin fosfat, 37°C derecede, 1 saat inkübe edilerek, nükleosidlere hidrolize edilmiştir. 20 µL, 3 mol asetat tamponu (pH=5) hidrolizata eklenerek, 20 µL, 50 mmol/L EDTA (10 mmol/L DFAM içinde) solüsyonu ile devam edilmiştir. Karışım, 0,22 µm millipore filtre ünitesinden filtre edilmiş, (ependorf tüplerin içindeki filtreler) 4 °C'de, 20 dakika 10000 g.de santrifuj edilerek santrifuj sonrası, örnekler 8-OHdG analizi için hazır hale getirilmiştir.

#### 4.7. 8-OHdG Analizi

Deneyin bu aşamasında Cayman DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA (Ürün No: 589320) ticari kit kullanılmıştır.

Tüm tampon ve reaktifler Cayman DNA/RNA Oksidatif Hasar EIA kitin kataloğunda anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. 96 kuyucuktan oluşan plate'e deney protokolünde yazdığı şekilde tamponlar, standartlar, hidrolizatlar ve monoklonal antikor eklenmiştir. Plate'in üzeri plastik film ile kapatılıp, karanlıkta plate çalkalayıcıda (shaker) 1,5 saat çalkalanmıştır. Daha sonra 405-420 nm arası dalga boyunda plate okutularak absorbanlar kaydedilmiştir.



## 5. BULGULAR

Bu çalışmada sucul ekosistemin indikatör organizması olan balıklara yüksek toksisite gösterdiği bilinen etofenproks kullanılmıştır. Laboratuvar şartlarında zebra balıkları 1hafta adaptasyon süresinin sonunda 8 µg/L yüksek ve 0,8 µg/L düşük konsantrasyonda teknik etofenproksa 48 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmış, bu saatlerin sonunda histolojik doku ve DNA örnekleri alınarak analiz edilip değerlendirilmiştir.

Etofenproksa 48 ve 96 saat maruz kalan zebra balıklarında kontrol grubuna kıyasla morfolojik olarak herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Davranışlar açısından ise yüksek doz etofenproksa maruz kalan balıkların diğer gruplardan farklı olarak grup halinde ve daha hızlı hareket ettikleri izlenmiştir.

### 5.1. 8-OHdG Analiz Sonuçları

Grupların ortalama 8-OHdG (ng/mL) değerleri elde edilerek gruplara göre karşılaştırma yapılmıştır.

48. saat etofenproks düşük doz 8-OHdG değerleri ortalama  $2829,20 \pm 235,48$  ng/mL olarak bulunmuştur. Bu değer kontrol grubunun ortalamasıyla ( $1780,43 \pm 47,70$  ng/mL) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

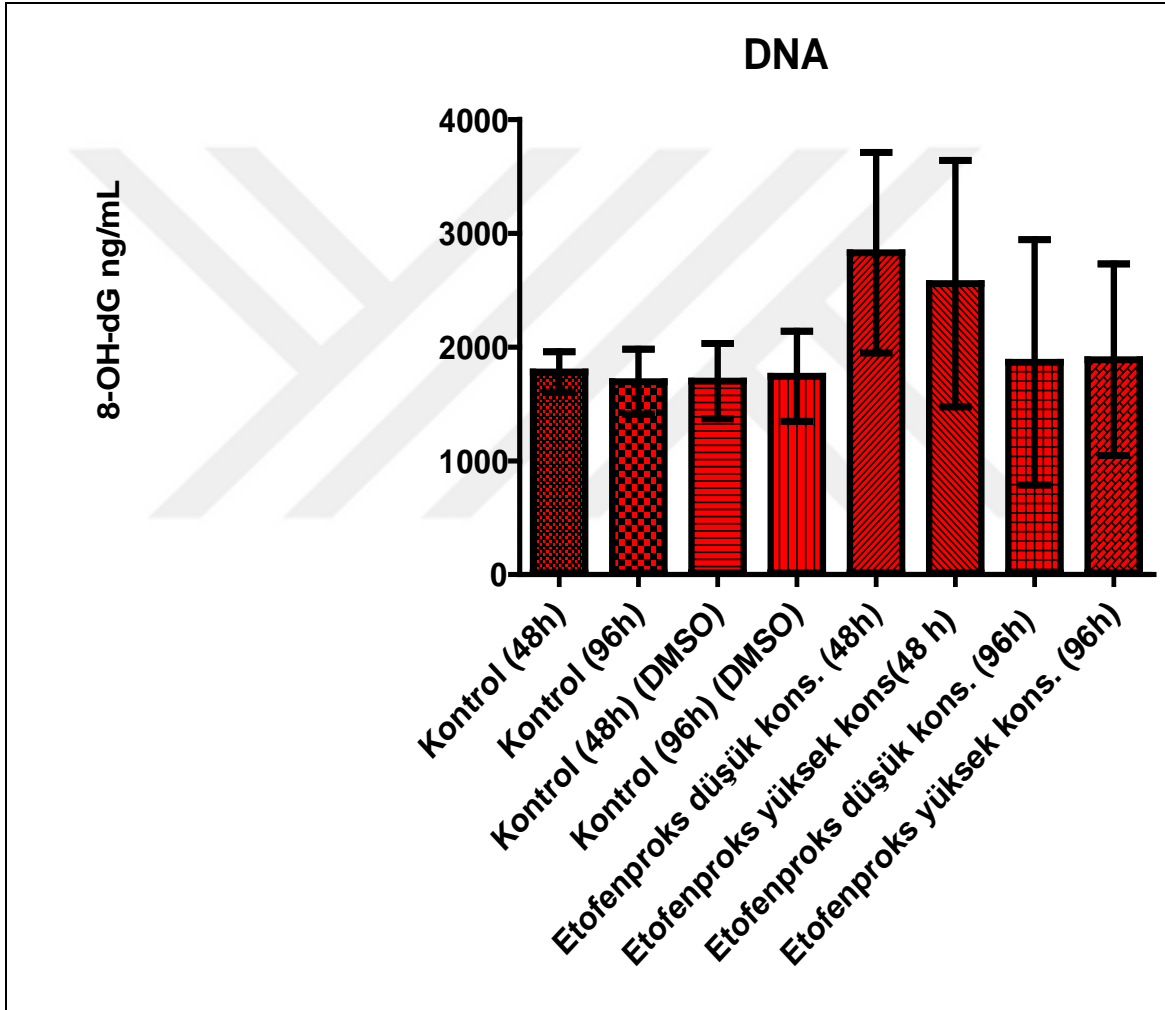
48. saat etofenproks yüksek doz grubunun ortalama 8-OHdG değeri  $2558,07 \pm 289,37$  ng/mL olup, kontrol grubuna göre ( $1780,43 \pm 47,70$  ng/mL) belirgin yüksek bulunmuştur ( $p < 0.01$ ).

48. saat etofenproks düşük doz ve yüksek doz ortalama değerleri karşılaştırıldığında ise belirgin bir fark bulunmamıştır.

96. saat etofenproks düşük doz ve yüksek doz 8-OHdG değerleri  $1865,63 \pm 287,98$  ve  $1887,51 \pm 225,12$  ng/mL olarak bulunmuştur ( $p > 0.01$ ). Bu değer kontrol grubunun ortalamasıyla ( $1694,85 \pm 76,44$  ng/mL) karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı görülmüştür.

96. saat etofenproks düşük doz ve yüksek doz ortalama değerleri karşılaştırıldığında ise aralarında bir fark bulunamamıştır.

48. saat etofenproks düşük ( $2829,20 \pm 235,48$  ng/mL) ve yüksek doz ( $2558,07 \pm 289,37$  ng/mL) grupları, 96. saat etofenproks düşük ( $1865,63 \pm 287,98$  ng/mL) ve yüksek doz ( $1887,51 \pm 225,12$  ng/mL) gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak belirgin bir fark olduğu görülmüştür. Şekil 5.1’de 8-OHdG sonuçlarına ilişkin bilgi verilmiştir.



Şekil 5.1. 8-OHdG sonuçları

## 5.2. Histopatoloji Sonuçları

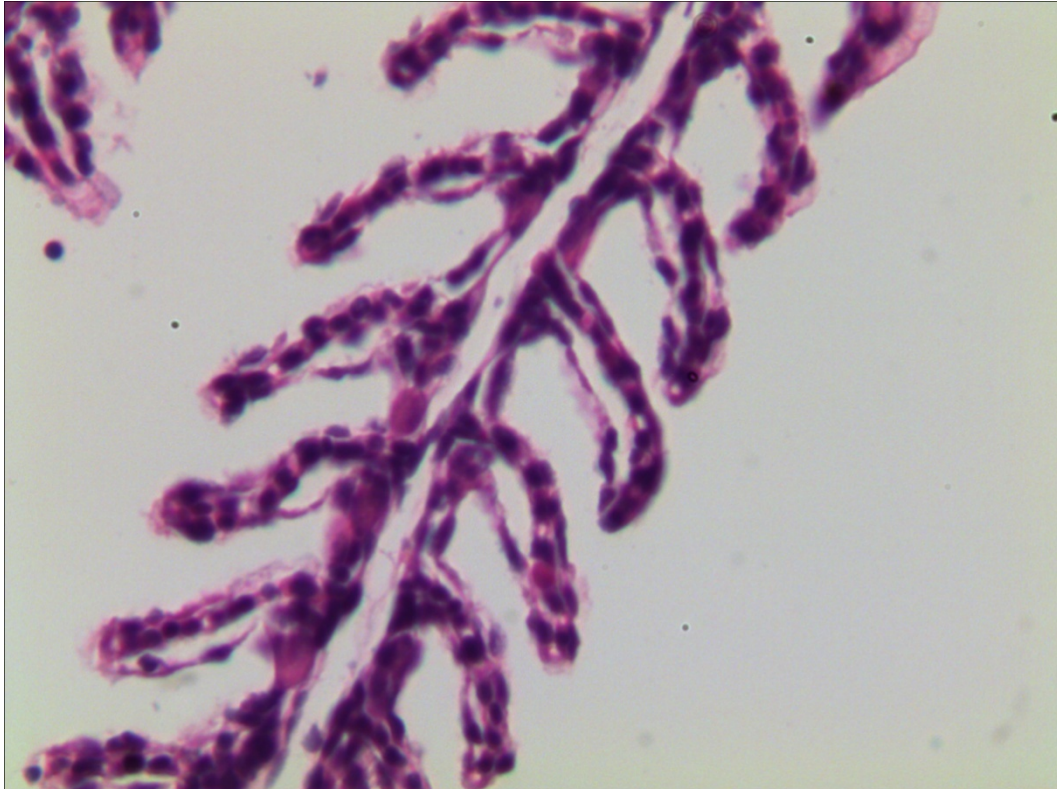
Kontrol ve DMSO kontrol gruplarından alınan balıklardan hazırlanan preparatlarda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Her akvaryumdan 7’şer adet balık alınmıştır. Zebra balıklarının nekropsilerinde iç organlarda makroskopik bulguya rastlanılmamıştır. Kontrol grubu ve etofenproksa maruz kalan gruplardan elde edilen deri

(kas) örneklerinde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Histopatolojide kullanılan bazı terimler EK.1.'de verilmiştir.

### 5.2.1. Solungaç dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Solungaç dokularında hiperemi ve epitel ayrılması en çok tespit edilen histopatolojik bulgular olarak belirlenmiştir. Sıklıkla görülen histopatolojik bulgular için 48 saat boyunca etofenproksa maruz kalma dahi yeterli olmuştur. Toksik maddeye daha uzun süre maruz kalma solungaç dokularında elde edilen epitel ayrılması bulgusunun şiddetlenmesine, daha yoğun olmasına ve daha fazla balıkta görülmesine sebebiyet vermezken hipereminin daha şiddetli görülmesine neden olmuştur. Bununla birlikte etofenproksa maruz bırakılan zebra balıklarının hiçbirisinde sağlıklı solungaç dokusuna rastlanılmamıştır. Zebra balıklarından elde edilen solungaç dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Resim 5.1.'de verilmiştir.

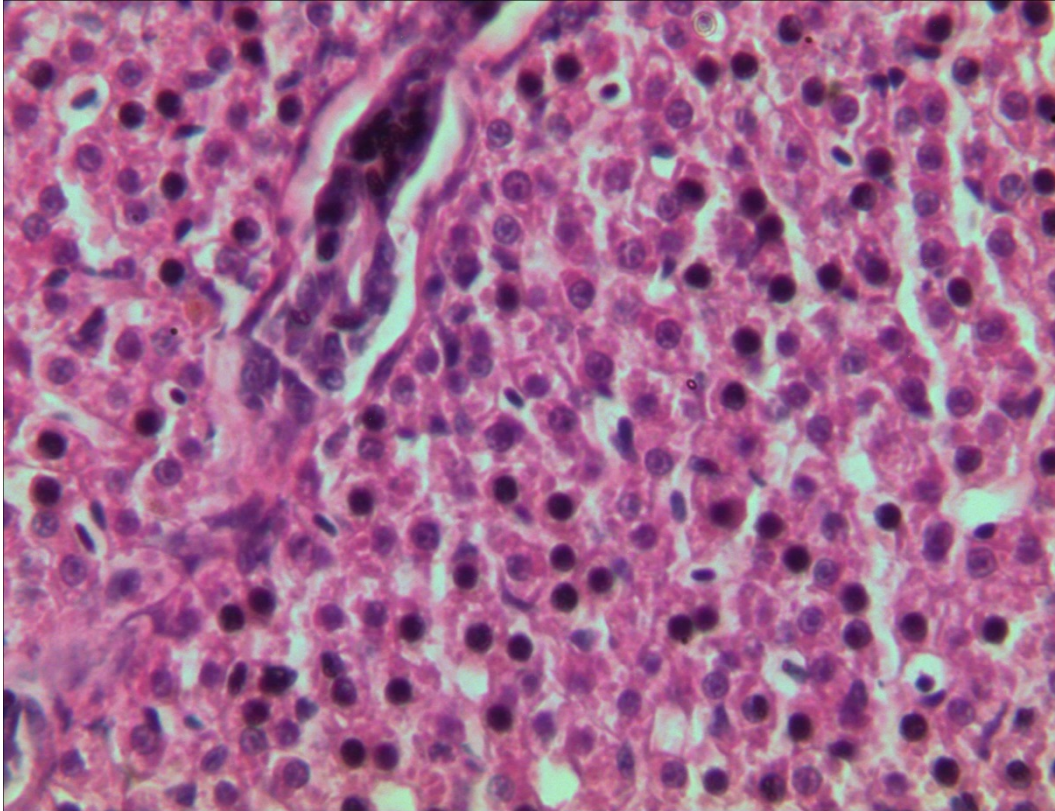


Resim 5.1. Solungaç dokularında epitel ayrılması (H&E,x100)

### 5.2.2. Karaciğer dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen karaciğer dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Hepatik dokularda hiperemi, hidropik dejenerasyon ve kuppfer hücrelerinde piknozis bulguları balıkların büyük bir çoğunluğunda görülen en önemli bulgular olarak tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda etofenproksa maruz kalan balıkların hepatic dokularında hiperemi görülürken düşük konsantrasyona maruz bırakılan balıklarda bu bulgu görülmemiştir. Düşük konsantrasyon 48 saat grubu balıklarda hidropik dejenerasyona rastlanmamış, diğer gruplarda hidropik dejenerasyon görülmüştür. 48 saat düşük ve yüksek konsantrasyon gruplarında kuppfer hücrelerinde piknozise rastlanmazken 96 saat düşük ve yüksek konsantrasyon gruplarında bu bulguya rastlanılmıştır. Zebra balıklarından elde edilen karaciğer dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Resim 5.2.'de verilmiştir.

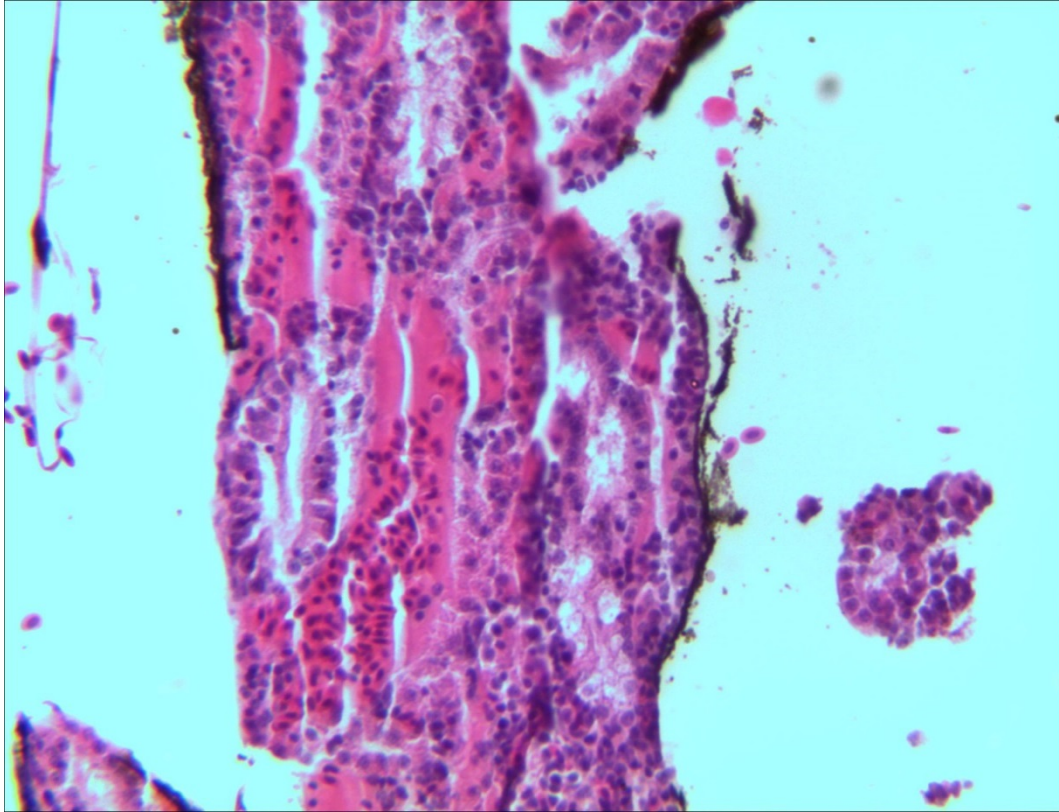


Resim 5.2. Kuppfer hücrelerinde piknozis (H&E,x40)

### 5.2.3. Böbrek dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen böbrek dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Böbrek dokularında kanama, şiddetli kanama, tubullerde hidropik dejenerasyon ve ödem etofenproksa maruz kalan zebra balıklarında en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır. Elde edilen histopatolojik bulgulara sadece 96 saat boyunca etofenproksa maruz kalan gruplarda rastlanmıştır. Bununla birlikte etofenproksa maruz bırakılan zebra balıklarının 48 saatlik grubunda böbrek dokularının sağlıklı olduğu görülmüştür. Böbrek dokularına ilişkin elde edilen histopatolojik bulgular Resim 5.3.'te verilmiştir.

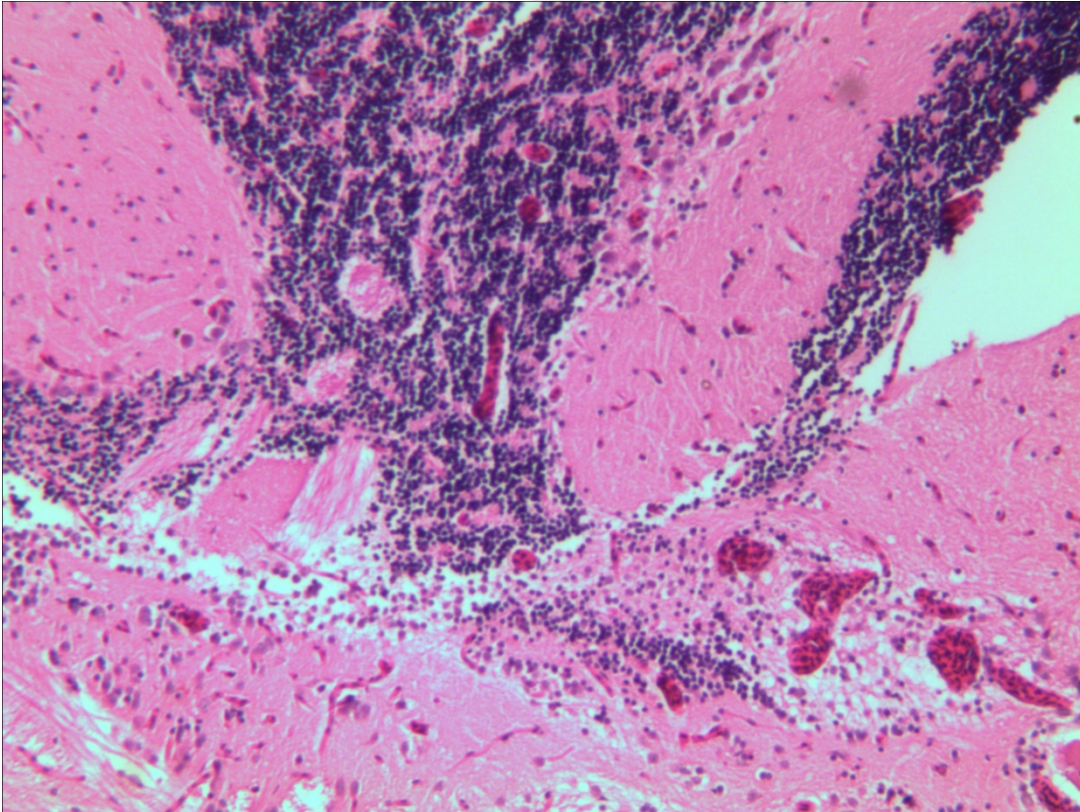


Resim 5.3. Böbrek dokusunda görülen kanama ve dejenerasyon (H&E,x20)

#### 5.2.4. Beyin dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen beyin dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Beyin dokularında en önemli histopatolojik bulgu olarak hiperemi görülmüştür. Elde edilen bu bulguya 48 saat yüksek doz grubunda ve 96 saat düşük ve yüksek doz gruplarında rastlanılmıştır. Bununla birlikte 48 saat düşük doz grubu balıklarının beyin dokusunda hiperemi görülmemiştir. Beyin dokularına ilişkin elde edilen histopatolojik bulgular Resim 5.4.'te verilmiştir.



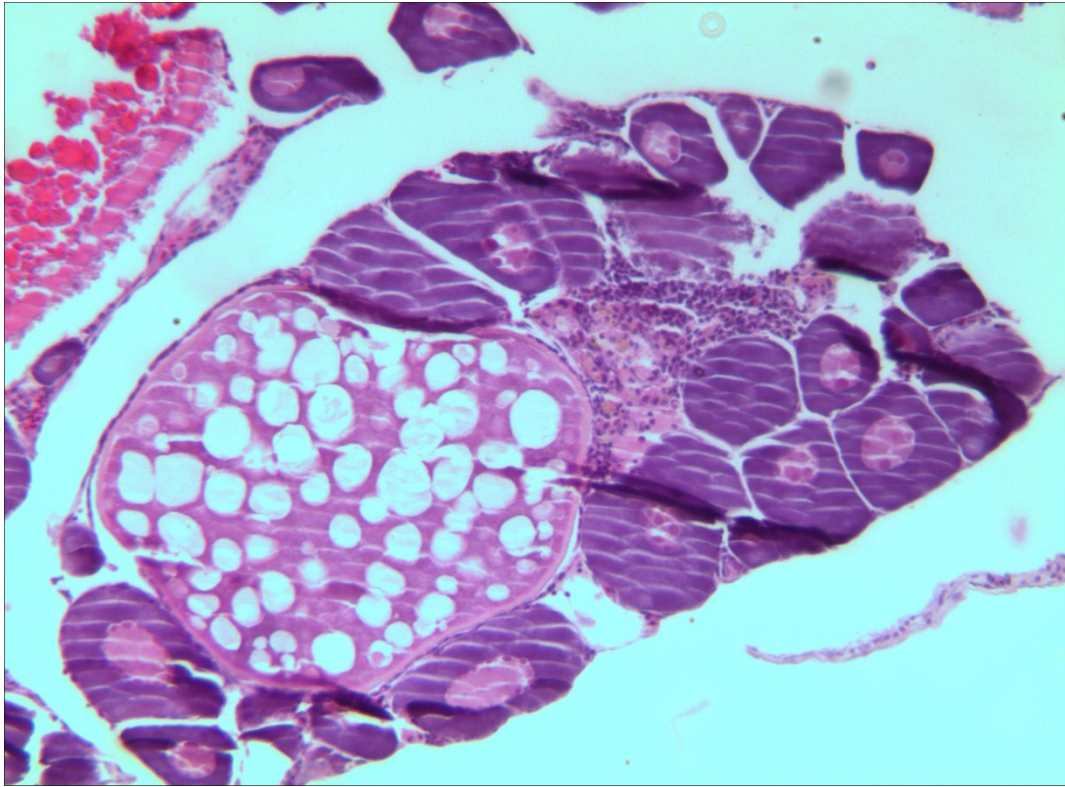
Resim 5.4. Beyin dokularında hiperemi (H&E,x100)

#### 5.2.5. Ovaryum dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen ovaryum dokularına

ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Ovaryum dokularında dejenerasyon ve ooforit bulguları balıkların büyük bir çoğunluğunda görülen en önemli bulgular olarak tespit edilmiştir. Bu bulgulara 48 saat düşük doz grubunda rastlanmazken, 48 saat yüksek doz ve 96 saat gruplarında rastlanılmıştır. Ovaryum dokularına ilişkin elde edilen histopatolojik bulgular Resim 5.5.'te verilmiştir.



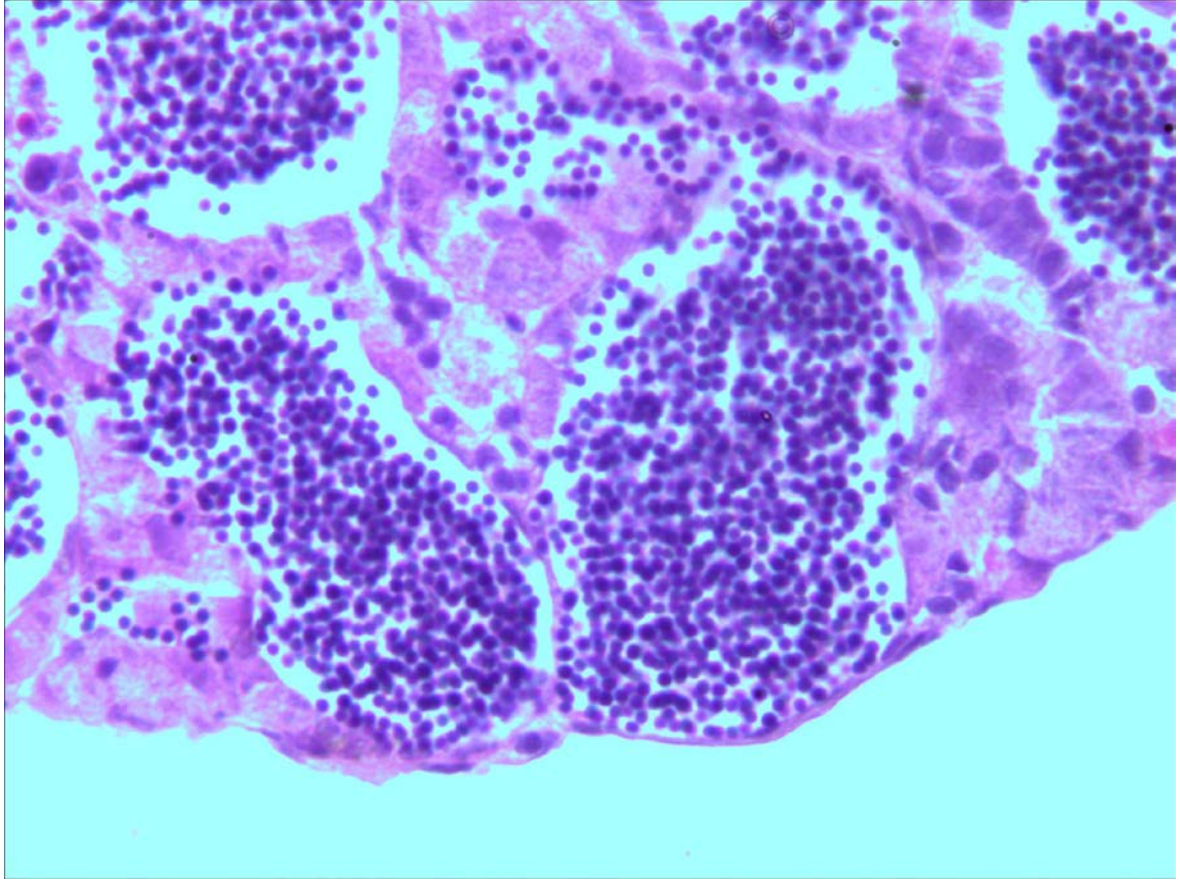
Resim 5.5. Ovaryumda dejenerasyon (H&E,x10)

#### 5.2.6. Testis dokularında görülen histopatolojik bulgular

Etofenproksa ilişkin subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen testis dokularına ilişkin histopatolojik bulgular Çizelge 5.1.'de verilmiştir.

Testis dokularında en çok rastlanılan histopatolojik bulgular sperm hücrelerinde azalma, leydig hücrelerinde hiperplazi ve dejenerasyondur. Bu bulgular 96 saat yüksek konsantrasyon grubu balıklarda görülmüştür. 48 saat düşük ve yüksek konsantrasyon ile 96 saat düşük konsantrasyon grubu balıklarda bu bulgulara rastlanılmamıştır. Testis

dokularına ilişkin elde edilen histopatolojik bulgular Resim 5.6.'da verilmiştir.



Resim 5.6. Testiste sperm hücrelerinde azalma ve leydig hiperplazi (H&E,x40)

Çizelge 5.1. Subletal dozda (8 µg/L) etofenproksa maruz kalan zebra balıklarının çeşitli dokularında görülen histopatolojik bulgular

Histopatolojik bulgular	Etofenproks konsantrasyonları			
	Düşük konsantrasyon		Yüksek konsantrasyon	
	Maruz kalma süresi (h)			
<b>SOLUNGAÇLAR</b>	48	96	48	96
Hiperemi	++	+++	++	++
Epitel ayrılması	+	+	+	+
<b>KARACİĞER</b>	48	96	48	96
Hiperemi	-	-	+	+
Hidropik dejenerasyon	-	+	+	+
Kupffer hücrelerinde piknozis	-	++	-	++
<b>BÖBREK</b>	48	96	48	96
Ödem	-	+	-	+
Kanama	-	+	-	+
<b>BEYİN</b>	48	96	48	96
Hiperemi	-	+	+	+
<b>OVARYUM</b>	48	96	48	96
Dejenerasyon	-	+	+	+
<b>TESTİS</b>	48	96	48	96
Leydig hücrelerinde dejenerasyon	-	-	-	+



## 6. TARTIŞMA

Etofenproks sindirim veya doğrudan temas yoluyla alındıktan sonra böceklerde sinir sistemine etki eden, geniş spektrumlu bir insektisittir. Tarım, bahçe bitkileri, bağcılık, ormancılık, hayvan sağlığı ve halk sağlığı uygulamalarında farklı canlılara karşı kullanılmaktadır. Bitki kökleri tarafından az miktarda emilir ve bitkide translokasyonu düşüktür. Halk sağlığında sıtma ile savaş da yaygın olarak kullanılmaktadır, ayrıca direkt uygulama veya kumaşların empregnasyonu yolu ile de insanlara ulaşmaktadır [27]. Bu çalışmada zebra balıkları etofenproksun subletal dozları olan 8 µg/L ve 0,8µg/L konsantrasyonlarına 48 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Maruziyeti takiben tüm balık dokudan elde edilen DNA örneğinden hidroliz basamağı sonrasında DNA oksidatif hasar ürünü olan 8-OHdG miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen en önemli sonuçlardan biri, 48 saat maruziyet sonrasında düşük ve yüksek doz grupların ortalama 8-OHdG düzeylerinin, kontrol grubunun ortalamasına göre anlamlı olarak yüksek bulunmasıdır. 96 saat maruziyet sonrasında ise düşük ve yüksek doz gruplarda, 48 saat gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülürken, kontrol gruplarında farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, etofenproksun DNA'da oksidatif hasara neden olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir. 96 saat maruziyet sonrası tespit edilen değerler akut dönemde görülen hasara karşın uzun dönemde adaptif ve artmış DNA onarım mekanizmalarının aktif olduğunu düşündürmektedir.

Histopatolojik incelemede kontrol gruplarında patolojik bir bulguya rastlanılmamıştır. Solungaç dokularında hiperemi, ikincil lamel üzerine epitel ayrılması; karaciğer dokuları üzerinde hiperemi, piknozis ve hidropik dejenerasyon; beyin ve böbrek dokularında hiperemi, ödem ve tubuler dejenerasyon iki farklı subletal etofenproks konsantrasyonuna maruz kalan zebra balıklarında en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır.

Son yıllarda çevrede uzun süre kalıcı etkisi olan ve bazılarının kullanımı yasaklanan, DDT ve benzeri pestisitler yerine daha seçici, toksisitesi düşük sentetik piretroid ve neonikotinoid pestisitler halk sağlığı ve tarımsal amaçlarla kullanımda tercih edilmektedir. Hedef olan böceklere karşı toksisitelerinin yanında bazı suçul organizmalara (insanların tükettiği balık örnekleri de vardır) da toksik etki göstermektedirler. Bazı toksik etkiler canlıların genetik yapısını bozabileceğinden hem popülasyonun üremesini olumsuz etkilemekte hem de ekolojik dengeyi bozabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda maruz

kalınan su kirleticisi pestisitler dış yapıda belirgin bir bozukluğa neden olmazken gen seviyesinde, biyokimyasal bazı parametrelerde ve doku-organ seviyesinde hasar yapabilmektedir. Doğal yüzey sularında tarımdan gelen noktasal olmayan kontaminasyon sonucu sucul canlılar insektisitlere maruz kalmakta; bunlarla beslenen ekosistemin ve dolayısıyla besin ağının diğer canlıları en üst kademede insanın tükettiği karnivor balıklara kadar bu çevresel kirlilikten etkilenmektedir. İnsektisitlerin ve diğer pestisitlerin tarımsal alanlardan bunlara komşu akarsu, göl ve gölet gibi su kaynaklarına başlıca taşınma yolları yüzeysel akıntı, direnaj, yeraltı suları, rüzgarla sürüklenme ve atmosferik taşınmadır [106]. Bu kirlilik yükünün maruz kalan canlılara toksik ve genotoksik etkileri birden çok bileşiğin bulunması, biyoakümülyasyon ve sedimente bağlı kalarak uzun süre yıkılmadan kalmaları gibi faktörlerden dolayı, tek bileşiğin kontrollü deney koşullarında belirlenen olumsuz sağlık etkilerinden çok daha fazla risk oluşturabilmektedir.

Gen düzeyinde yapılan farklı çalışmalarda etofenproksun önemli agonistik aktivitesinin bulunmamasına rağmen [107], antiöstrojenik ve tiroid hormon antagonist aktivitesinin gözlenmesi, etofenproks ve diğer piretroidlerin çoklu etki mekanizmasına sahip olabileceğini düşündürmüştür [108].

WHO ve CDC biyoyöntemlerinin kullanıldığı direnç testlerinde etofenproksa karşı yüksek düzeyde direncin DDT'ye benzer şekilde hedef hassasiyetinin azalması olarak açıklanmıştır [109]. Farklı canlılarda insektisitler arasında çapraz direnç bulunduğu gibi oksidatif mekanizmaya (cyp450) dayalı direnç de bildirilmiştir [110].

Zebra balıklarında (*Danio rerio*) yapılan bir diğer araştırmada ise teknik etofenproksun (%95 konsantrasyon) karışım içindeki toksisitesi belirlenmiş ve LC50 değerlerine göre karışımlarda kullanılan insektisitlerin toksisite sırası: permetrin>bifentrin>tetrametrin>etofenproks>foksim >diklorvos olarak bildirilmiştir [111]. Zebra balıklarına etofenproksun akut toksisitesi: 24, 48, 72 ve 96 saat LC50 değerleri sırasıyla 96.9 µg/L, 86.5 µg/L, 82.5 µg/L ve 79.1 µg/L'dir. Diklorvos ve foksim ile karıştırıldığında etofenproks toksisitesi foksim ile birlikte uygulandığında, diklorvosdan daha toksik bulunmuştur. Diğer bir çalışmada etofenproksun farklı beş dozu (%30 EC) canlıların farklı yaşam evrelerinde kullanılmıştır [112] ve cinse bağlı olarak 24 ve 48 saatlik akut toksisite değerleri farklı bulunmuştur. Benzer şekilde DeLorenzo ve Leon tarafından yapılan çalışmada da embriyo, larva ve ergin bireylerde 96 saat LC50 değerleri farklı hesaplanmıştır. Ayrıca lipid

peroksidasyonu seviyeleri larva ve erginlerde azalmış, ancak glutatyonda değişiklik olmamıştır. Böylece etofenproksun sucul canlılarda yüksek derecede toksik olduğu sonucuna varılmıştır[113].

Etofenproks için yapılan çalışmalar değişik türlerde farklı insektisitler ile karşılaştırmaları, gıda maddelerinde bulunan kalıntı incelemelerini de içermektedir [114-115].

Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan tarım işçilerinde birçok genetik hasarın yanı sıra karaciğer, böbrek ve kaslarda dabozukluklar görülmüştür. Pestisitlerin canlılar üzerindeki etkisi fetal yaşamdan itibaren başlamaktadır. Bu ilaçlar plasentadan fetüse geçmekte ve bunun sonucu olarak düşükler, hiperpigmente ve hiperkeratolitik çocuk doğumları görülmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde ise radyoaktif olarak işaretlenip anneye verilen pestisitlerin 5 saat sonra plasentadan fetüse geçtiği ve fetüsün göz, sinir sistemi ve karaciğerine yerleştiği gözlenmiştir.

Bu çalışmada da, etofenproksun zebra balıklarında oluşturduğu genotoksik ve histopatolojik hasardaki olası rolünü belirlemek amacıyla, tüm gruplardaki 8-OHdG düzeyleri enzim immün yöntem ile çalışılmış ve tüm dokularda histopatolojik inceleme yapılmıştır. 8-OHdG düzeyinin akut dönemde yüksek olduğu ama maruziyet devam ettikçe olası tamir mekanizmaların aktive olmasına bağlı DNA oksidatif hasar düzeyinde azalma olduğu gözlenmiştir.

Tüm bu bulgular; etofenproksun zebra balıkları üzerinde yapmış olduğu genotoksik ve histopatolojik etkiler göz önünde bulundurulduğunda, bu pestisitlerin dünyadaki kullanımının yaygınlığına, kullanım alanının çeşitliliğine ve çok kullanılıyor olmasına da bağlı olarak tüm canlılar üzerinde mutajenik ve genotoksik olarak potansiyel bir tehlikeye yol açtığını düşündürmektedir.



## 7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada zebra balıkları etofenproks için subletal doz olarak belirlenmiş olan 8 µg/L konsantrasyona ve 0,8µg/L konsantrasyona 48 ve 96 saat boyunca maruz bırakılmışlardır.

Sonuç olarak çalışmamızda 48 saat düşük ve yüksek doz gruplarının ortalama 8-OHdG düzeyi, kontrol grubunun ortalamasına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. 96 saat düşük ve yüksek doz balıklarda ise 48 saat gruplarına göre belirgin olarak düşük ve kontrollerin düzeyine yakın düzeyde olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, etofenproksun DNA'da oksidatif hasara neden olabileceğini göstermesi bakımından önemlidir.

Kontrol gruplarında herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmamıştır. Solungaç dokularında hiperemi, ikincil lamel üzerine epitel ayrılması; karaciğer dokuları üzerinde hiperemi, piknozis ve hidropik dejenerasyon; beyin ve böbrek dokularında hiperemi, ödem ve tubuler dejenerasyon iki farklı subletal etofenproks konsantrasyonuna maruz kalan zebra balıklarında en çok rastlanan histopatolojik bulgulardır.

Etofenproksun bu çalışmada zebra balıkları üzerinde yapmış olduğu genotoksik ve histopatolojik etkiler göz önünde bulundurulduğunda, bu pestisitinin dünyadaki kullanımının yaygınlığına, kullanım alanının çeşitliliğine ve çok kullanılıyor olmasına da bağlı olarak sucul organizmalara ilişkin olarak yaratacak olduğu potansiyel tehlikeye ilişkin daha fazla önem verilmeli ve daha detaylı çalışmalarla sucul organizmalarda özellikle de balıklardaki mekanizma ve DNA metabolizması ile olan etkileşimi açığa çıkarılarak, pestisitinin mutajenik ve genotoksik durumu daha detaylı olarak ortaya çıkarılmalıdır.



## KAYNAKLAR

1. Vural, N. (1996). *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 342-363.
2. Birkhoj, M., Nellemann, C., Jarfelt, K., Jacobsen, H., Andersen, H. R., Dalgaard, M. and Vinggaard, A. M. (2004). The Combined Antiandrogenic Effects of Five Commonly Used Pesticides. *Toxicology Applied Pharmacology*, 201, 10-20.
3. Karakaya, M., Boyraz, N. (1992). Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları. Konya: *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Çevre Dergisi*, 1, 4, 11-15.
4. Büyükgüzel, E. (2013). Protein oksidasyonunun biyokimyasal ve moleküler mekanizması. Zonguldak: *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3(1), 40-51.
5. Gökpınar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T. ve Durmaz, Y. (2006). Algal antioxidants (in Turkish with English abstract). *Ege Journal of Fish Aqua Scientific*, 23(1/1), 85-89.
6. Keleştemur, T. G. (2012). Physiological effects created on fish of hypoxic waters (in Turkish with English abstract). *Turkish Journal of Scientific Reviews*, 5(1), 87-90.
7. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M. and Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 178-189.
8. Liao, Y. J., Ueno M., Nakagawa T., Huang C., Kanenishi K., Onodera M., Sakamoto H. (2005). Oxidative damage in cerebral vessels of diabetic db/db mice. *Diabetes Metabolism Research Reviews*, 21(6), 554-9.
9. Hsieh, R. H., Lien, L.M., Lin, S. H., Chen, C. W., Cheng, H. J. and Cheng, H. H. (2005). Alleviation of oxidative damage in multiple tissues in rats with streptozotocin-induced diabetes by rice bran oil supplementation. *Ann N Y Acad Science*, 1042, 365-71.
10. Hamilton, M. L., Guo Z., Fuller, C. D., Van Remmen, H., Ward, W. F., Austad, S. N., Troyer, D. A., Thompson, I. and Richardson, A. (2001). A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Research*, 29(10), 2117-26.
11. Floyd, R. A. (1990). The development of a sensitive analysis for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radical Research Communications*, 8(3), 139-41.
12. Tiryaki, O., Canhilal, S. (2010). Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. Kayseri: *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2), 154-169.
13. Dağ, S. (17-21 Ocak 2000). Türkiye'de Tarım İlaçları Endüstrisi ve Geleceği. V. *Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Bildirileri 2. Cilt*. Ankara: TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, 933-958.

14. İnternet: II. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu Kitabı (27-29 Mayıs 2009, Van) URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.tarimsalpazarlama.com%2Fmakale.php%3Fid%3D3051&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2014.
15. Oskam, A. J., Vijftines, R. N. A., and Graveland, C. (1997). *Additional E.U. Policy instrumans for plant protection*. Wageningen Agricultural University, the Netherlands.
16. Turabi, M. S. (25-26 Ekim 2007). Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi. *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası, Bildiriler Kitabı*, 50-61.
17. Delen, N. (2008). *Fungisitler*. Nobel Yayın Dağıtım. Ankara: Nobel Yayın No: 1360.
18. Yıldız, M., Gürkan, O., Turgut, C., Kaya, Ü. ve Ünal, G. (3-7 Ocak 2005). *Tarımsal Savaşımında Kullanılan Pestisitlerin Yol Açtığı Çevre Sorunları*. VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara.
19. Rand, G. M. and Petrocelli, S. R. (1985). *Fundamentals of aquatic toxicology, methods and applications, hemisphere publishing cooperation*. Washington, 666.
20. Öztürk, S. (1990). *Tarım İlaçları*. İstanbul: Hasad Yayıncılık, 523.
21. Yazgan, M. S. (1997). *Türkiye’de pestisit kirliliği*. Türkiye’de Çevre Kirlenmesi Öncelikleri Sempozyumu II. Gebze, 571-577.
22. İnternet: Anonim (2003). URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.dogainsanisbirligidernegi.org.tr&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 20 Şubat 2016.
23. Whittle, D. M. and Fitzsimons, J. D. (1983). *The influence of the Niagara River on contaminants burdens of Lake Ontario biota*, 9, 295-302.
24. Johnson, B. T., Saunders, C. R., Saunders, H. D. and Campbell, R. S. (1971). *Biological magnification and degradation of DDT and aldrin by freshwater invertebrates*, 28, 705.
25. Crosby, D. G. and Tucker, R. K. (1971). *Accumulation of DDT by Daphnia magna*. Environmental Science and Technology, 5, 714-716.
26. Sanders, H. O., Huckins, J., Johnson, B. T. and Skaar, D. (1981). Biological effects of kepone and mirex in freshwater in vertebrates. Archives Environmental Contamination & Toxicology, 10, 531-539.
27. Canton, J. H., Greve, P. A., Slooff, W. and Van, Esch, G. J. (1975). *Toxicity accumulation and elimination studies of hexachlorocyclohexane ( $\alpha$ - BHC) in a laboratory freshwater food chain*. Environmental Pollution, 221, 97-108.
28. Hansen, P. (1980). *Uptake and transfer of the chlorinated hydrocarbon lindane ( $\gamma$ - BHC) in a a laboratory freshwater food chain*. Environmental Pollution, 21, 97-108.

29. Harding, G. C. (1986). *Organochlorine dynamics between zooplankton and their environment, a reassessment*. Marine Ecology Progress Series, 33,167-191.
30. Esser, H. O. (1986). *A review of the correlation between physicochemical properties and bioaccumulation*. Pesticide Science, 17, 265-276.
31. Tardiff, R. G. (1992). *Methods to assess adverse effects of pesticides*. England, 81(1), 87.
32. Hosokawa, M., Endo, G. and Kuroda, K. (1995). *Acute toxic effect of river yodo water (Japan) on Daphnia magna*. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 55, 419-425.
33. Beven, K. and Germann, P. (1982). *Macropores and water flow in soils*. Water Resources Research, 18,1311-1325.
34. Leonard, R. A. (1990). *Movement of pesticides into surface waters*. In: Pesticides in the soil environment, 2,103-349.
35. Anonymous. (1993). *Decision-making scheme for the environmental risk assesment of plant protection products*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 23,1.
36. Yücer, M. (1995). *Ruhsatlı Tarım İlaçları*. (Registered Agrochemicals in Turkey). Hasad yayıncılık, İstanbul.
37. Öncüer, C., Durmuşoğlu, E. (2008). *Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları*. Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, 28, 472.
38. Toros, S., Maden, S., Sözeri, S., 1999. *Tarımsal Savaş Yöntem ve İlaçları*. Ankara: Genişletilmiş III. Baskı. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, 462, 417.
39. Ayaz, A., Yurttagül, M. (2012). *Besinlerdeki toksik öğeler-II*. Sağlık Bakanlığı Yayınları, 727.
40. İnternet: Sentetik piretroidler. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ziraattube.com&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 15 Mayıs 2015.
41. İnternet: Sentetik piretroidler. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.piercenet.com%2Fbrowse.cfm%3FfldID%3D8259A7B6-7DA6-41CF-9D55AA6C14F31193&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 20 Mayıs 2015.
42. Benli, A. C. K. (2014). *The Influence of Etofenprox on Narrow Clawed Crayfish (Astacus leptodactylus Eschscholtz, 1823): Acute Toxicity and Sublethal Effects on Histology, Hemolymph Parameters, and Total Hemocyte Counts*. Environmental Toxicology, 30(8), 887-94.
43. İnternet: Etofenproksun kimyasal formülü. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.alanwood.net&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 21 Mayıs 2015.

44. WHO. (2007). *WHO Specifications and Evaluations for Public Health Pesticides*. Etofenprox. WHO, Geneva.
45. Ramos, R., Martinez and Castelao, A. (2008). Lipoperoxidation and hemodialysis. *Metabolism Clinical and Experimental*, 57, 1369-1374.
46. Aruoma, O. I. (1998). Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease. *Journal of The American Oil Chemists Society*, 75(2), 199- 212.
47. Young, I. S. and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176- 186.
48. Gupte, A. and Mumper, R. J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, 35, 32-46.
49. Lenaz, G. (1998). Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1366, 53-67.
50. Ames, B. N., Shigenaga, M. K. and Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 7915-7922.
51. Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A. M. and Keller, J. N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis. Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 773, 93-104.
52. Seven, A., Güzel, S., Aslan, M. ve Hamuryudan, V. (2008). Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clinical Biochemistry*, 41, 538-543.
53. Correa-Salde, V. and Albasa, I. (2009). Reactive oxidant species and oxidation of protein and hemoglobin as biomarkers of susceptibility to stress caused by chloramphenicol. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63, 100-104.
54. Kamat, J. P. (2000). Devasagayam TPA. Oxidative damage to mitochondria in normal and cancer tissues, and its modulation. *Toxicology*, 155, 73-82.
55. Kohen, R. and Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
56. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J. Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.
57. Bassi, P. M. D. and Sacco, E. M. D. (2009). Cancer and aging. The molecular pathways. *Urologic Oncology*, 27, 620-627.
58. Kocha, T., Yamaguchi, M., Ohtaki, H., Fukuda, T. and Aoyagi, T. (1997). Hydrogen peroxide- mediated degradation of protein. Different oxidation modes of copper- and

- iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337, 319-326.
59. Cross, C. E., Reznick, A. Z., Packer, L., Davis, P. A., Suzuki, Y. J., Halliwell, B. (1991). Oxidative damage to human plasma proteins by ozone. *Free Radical Research Communications*, 15(6), 347-352.
  60. Halliwell, B. (2007). Biochemistry and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(5), 1147-1150.
  61. Davies, M. J., Donkor, R., Dunster, C. A., Gee, C. A., Jonas, S. and Willson, R. L. (1987). Desferal and superoxide free radicals. *Biochemistry Journal*, 246, 725- 729.
  62. Rosen, M. G., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S. and Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 9( 2), 200- 209.
  63. Karakoç, A., Yılmaz, M., Çakır, N. ve Arslan N. (1999). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Endokrinol Yöneliş*, 8(3), 28-32.
  64. Hocoğlu, L., Gültekin, F. ve Türkay, C. (1994). Serbest radikaller ve neden olduğu hastalıklar. *İlaç Tedavi Dergisi*, 7(4), 227-32.
  65. Halliwell, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radicall Research*, 25(1), 57-74.
  66. Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*, 91, 179-94.
  67. Frenkel, K. (1992). Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage. *Pharmacology Therapeutics*, 53(1), 127-66.
  68. Leopold, J. A. and Loscalzo, J. (2005). Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thrombosis and Vascular Biology*, 25(7), 1332-40.
  69. İnternet: Altınışik, M. Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar. (2000). URL:<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mustafaaltinisik.org.uk%2F21-adsem-01.pdf+%&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 19 Kasım 2015.
  70. Huang, H. and Manton, K. G. (2004). The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Bioscience*, 9, 1100-17.
  71. Adam-Vizi, V. (2005). Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxidant Redox Signaling*, 7(9-10), 1140-9.
  72. Moldovan, L., and Moldovan, N. I. (2004). Oxygen free radicals and redox biology of organelles. *Histochemical Cell Biology*, 122(4), 395-412.

73. Valent, S., and Toth, M. (2006). Activation energy determinations suggest that thiols reverse autooxidation of tetrahydrobiopterin by a different mechanism than ascorbate. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(10), 1786-93.
74. Brusov, O. S., Gerasimov, A. M. and Panchenko L. F. (1976). The influence of natural inhibitors of radical reactions on autooxidation of adrenaline. *Bulletin of Eksperimental Biology and Medicine*, 81(1), 33-5.
75. Bazan, N. G. (1989). Metabolism of arachidonic acid in the retina and retinal pigment epithelium: biological effects of oxygenated metabolites of arachidonic acid. *Progress in Clinical and Biological Research Journal*, 312, 15-37.
76. Tang, D. G., Chen, Y. Q. and Honn, K. V. (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A.*, 28, 93(11), 5241-6.
77. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata, M. and Oikawa, S. (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 32(9), 822-32.
78. Nagata, M. (2005). Inflammatory cells and oxygen radicals. *Current Drug Targets Inflammation & Allergy*, 4(4), 503-4129
79. Forman, H. J. and Torres, M. (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, 166(12 Pt 2), 4-8.
80. Kovacic, P., Pozos, R. S., Somanathan, R., Shangari, N. O. and Brien, P. J. (2005). Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*, 12(22), 2601-23.
81. Shi, H., Shi, X. and Liu, K. J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255(1-2), 67-78.
82. Tsutsui, H., Ide, T., Shiomi, T., Kang, D., Hayashidani, S., Suematsu, N., Wen, J., Utsumi, H., Hamasaki, N., Takeshita, A. and et al. (2001). 8-oxodGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation*, 104(24), 2883-5.
83. Floyd, R. A. (1990). The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11(9), 1447-50.
84. Bigot, K., Leemput, J., Vacher, M., Campalans, A., Radicella, J. P., Lacassagne, E. and et al. (2009). Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) in mouse retina. *Molecular Vision*, 15, 1139-52.
85. Shin, C. S., Moon, B. S., Park, K. S., Kim, S. Y., Park, S. J., Chung, M. H. and Lee, H. K. (2001). Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes Care*, 24(4), 733-7.

86. Berwick, M. and Vineis, P. J. (2000). Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *National Cancer Institute*, 92(11), 874-97.
87. Nakano, T., Morishita, S., Katafuchi, A., Matsubara, M., Horikawa, Y., Terato, H. and et al. (2007). Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks. *Molecular Cell*, 28(1), 147-58.
88. Bohr, V. (2002). Repair of Oxidative DNA Damage in Nuclear and Mitochondrial DNA, and Some Changes with Aging in Mammalian Cells. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 32(9), 804-12.
89. Yndestad, A., Neurauder, C. G., Oie, E., Forstrom, R. J., Vinge, L. E, Eide, L., Luna, L., Aukrust, P. and Bjoras, M. (2009). Up-regulation of myocardial DNA base excision repair activities in experimental heart failure. *Mutation Research*, 666(1-2), 32-8.
90. Richter, C. (1997). Free Radical Mediated DNA Oxidation. In: Wallace, K. B., editor. *Free Radical Toxicology*. Target Organ Toxicology Series. Washington: Taylor & Francis, 89-111.
91. Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 10(3-4), 225-42.
92. Loft, S., Høgh Danielsen, P., Mikkelsen, L., Risom, L., Forchhammer, L. and Møller P. (2008). Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 5), 1071-6.
93. Xu, G. W., Yao, Q. H., Weng, Q. F., Su, B. L., Zhang, X. and Xiong, J. H. (2004). Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis*, 36(1), 101-4.
94. Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B. (1995). DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Letters*, 93(1), 113-20.
95. ESCODD. (2002). Inter-laboratory validation of procedures for measuring 8-oxo-7,8-dihydroguanine/8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA. *Free Radical Biology & Medicine Journal*, 36(3), 239-45.
96. Arnao, M. B., Acosta, M. and Cano, A. (2002). Amino Acid Analysis by HPLC. In: Cazes, J., Marcel Dekker, editors. New York: *Encyclopedia of Chromatography*, 26-9.
97. İnternet: *İşcan, E. Kalite Kontrol Laboratuvarı*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.kayabek.net%2Fdosya%2F+kalitekontrol+laboratuvarı.pdf&date=2016-03-27>, Son Erişim Tarihi: 9 Aralık 2015.
98. Yokuş, B. and Çakır D. Ü. (2002). *İn vivo* Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 22, 535-43.

99. Lancas, F. M. and de Moraes, M. (2002). Analysis of Alcoholic Beverages by GC. In: Cazes, J., Marcel Dekker, editors. New York: *Encyclopedia of Chromatography*, 38-41.
100. Devanaboyina, U. and Gupta, R. C. (1996). Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by <sup>32</sup>P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*, 17(5), 917-24.
101. Gupta, R. C. and Arif, J. M. (2001). An improved (<sup>32</sup>)P-postlabeling assay for the sensitive detection of 8-oxodeoxyguanosine in tissue DNA. *Chemical Research Toxicology*, 14(8), 951-7.
102. Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997). Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 18(11), 2225-31.
103. Collins, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research*, 681(1), 24-32.
104. Hinton, D. E., and Lauren, D. J. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J. F., Shugart, L. R. (eds.). Lewis Publishers. Boca Raton: *Biomarkers of environmental contamination*, 17-57.
105. TEH, S. J., ADAMS, S. M. and HINTON, D. E., (1997). Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, 37, 51-70.
106. Schulz, R. (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *Journal of Environmental Quality*, 33, 419-48.
107. Hinton, D. E. and Lauren, D. J. (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential biomarkers of exposure. In: McCarthy, J. F., Shugart, L. R. (eds.) Lewis Publishers. Boca Raton: *Biomarkers of environmental contamination*, 17-57.
108. Du, G., Shen, O., Sun, H., Fei, J., Lu, C., Song, L., Xia, Y., Wang, S. and Wang, X. (2010). Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays. *Toxicology Science*, 116, 58-66.
109. Fonseca-Gonzalez, I., Quinones, M. L., Audrey Lenhart, A. and Brogdon, W. G. (2011). Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. *Pest Management Science*, 67, 430-437.
110. Zimmer, C. T. and Nauen, R. (2011). Cytochrome P450 mediated pyrethroid resistance in European populations of *Meligethes aeneus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Pest Biochemical Physiology*, 100, 264-272.

111. Zhang, Z. Y., Yu, X. Y., Wang, D. L., Yan, H. J., Liu, X. J. 2009. Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Management Science*, 66, 84-89.
112. Yameogo, L., Traore, K., Back, C., Hougard, J. M. and Calamari, D. (2001). Risk assessment of etofenprox (Vectron) on non-target aquatic fauna compared with other pesticides used as Simulium larvicide in a tropical environment. *Chemosphere*, 42, 965-74.
113. DeLorenzo, M. E., De Leon, R. G. (2010). Toxicity of the insecticide etofenprox to three life stages of the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, 985-90.
114. Barbee, G. C., McClain, W. R., Lanka, S. K., Stout, M. J. (2010). Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish cropping systems. *Pest Management Science*, 66, 996-1001.
115. Chun, O. K., Kang, H. G.(2003). Estimation of risks of pesticide exposure, by food intake, to Koreans. *Food Chemical Toxicology*, 41, 1063-76.





**EKLER**

## EK-1.Bazı terimler

**Aditif etki:** İki veya daha fazla sayıda ilaç birlikte kullanıldığında görülen ve her birinin bireysel etkilerinin aritmetik toplamına eşit olan toplam etkidir.

**Advers etki:** Bir ilacın hastalıktan korunma, bir hastalığın teşhis veya tedavisi veya bir fizyolojik fonksiyonun iyileştirilmesi, düzeltilmesi veya değiştirilmesi amacıyla kabul edilen normal dozlarda kullanımında ortaya çıkan zararlı ve amaçlanmamış bir etkidir.

**Antagonistik etki:** Ters sinerjistik etki. Bileşkenin birimlerinin herbirine göre daha az etkili olmasıdır.

**Empregnasyon:** Isı ile yapılan emdirme işlemidir.

**Hidropik dejenerasyon:** Daha şiddetli akut hücre şişkinliği şekillerindedir. Hidropik dejenerasyonda hücre sitoplazmasında aşırı miktarda ve sitoplazmanın her tarafına yayılmış bir sıvı artışı vardır. Şiddetli olgularda su alan hücreler balon gibi şişmişlerdir.

**Hiperemi:** Arteriyel damarların dilatasyonu sonucu bir bölgeye arteriyel kanın fazlaca gelmesi olayıdır.

**Hiperplazi:** Bir organın ya da dokunun büyüklüğündeki artmadır; o doku ya da organa özgü hücrelerin sayıca artışına bağlıdır.

**Kupffer hücresi:** Karaciğerde bulunan ve retiküloendotelyal sistemin bir bölümünü oluşturan özelleşmiş makrofajlardır.

**Leydig hücresi:** Testiste seminifer tüpçükleri arasında bulunan, testosteron hormonu salgılayan, insanda içinde bulunan Reinke kristalleri ile tanınan hücrelerdir.

**Ooforit:** Yumurtalıkların iltihabıdır.

**Piknozis:** Hücre nükleusunda büzüşme ve opaklaşma durumudur.

**Pürin:** Adenin ve guaninden oluşan DNA bazıdır.

**Sinerjistik etki:** Kimyasal maddelerin ve süreçlerin öngörülemeyen kombinasyonlar oluşturarak beraber tepkimeye girme ve bunun sonucunda da tek başlarına sahip olduklarından belirgin bir biçimde daha güçlü ya da bütünüyle farklı bir etki gösterme eğilimleridir.

EK-1. (devam) Bazı terimler

**Translokasyon:** Bir kromozomun kopan parçasının başka bir kromozoma yapışmasıdır.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı adı : AĞIRBAŞLI Neslihan  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 15.10.1980, Ankara  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0(312)202 4362  
e-mail : nesli@gazi.edu.tr



### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Çevre Bilimleri Bölümü	Devam Ediyor
Lisans	Erciyes Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2006
Lise	Ankara Lisesi	1997

### İş Deneyimi

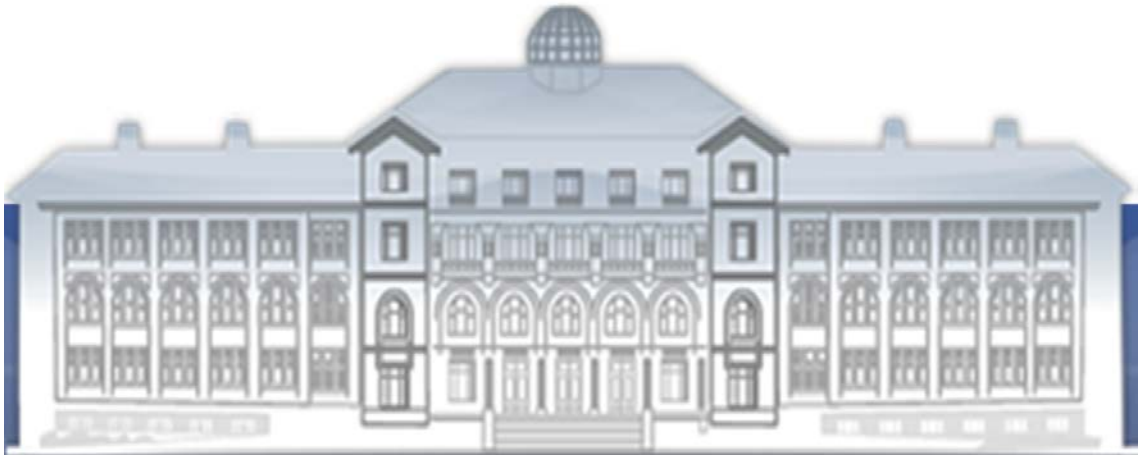
Yıl	Yer	Görev
2006-Halen	Gazi Üniversitesi	Biyolog

### Yabancı Dil

İngilizce

### Hobiler

Müzik, Sinema, Spor



*GAZİ GELECEKTİR..*