

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Özge TEMİZ

***Oreochromis niloticus*'da BEYİN DOKUSUNDA FENTHİONUN PİPERONİL
BÜTOKSİD MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON METABOLİZMASI,
HSP70, ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİ ve LİPİD
PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ**

BIYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2011

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***Oreochromis niloticus*'da BEYİN DOKUSUNDA FENTHİONUN
PİPERONİL BÜTOKSİD MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON
METABOLİZMASI, HSP70, ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİ ve
LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ**

Özge TEMİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez/...../2011 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.**

.....
Prof.Dr. Nevin ÜNER
DANIŞMAN

.....
Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER
ÜYE

.....
Yrd.Doç.Dr. Petek PİNER
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. İlhami YEĞİNGİL
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından desteklenmiştir.
Proje No:FEF2009YL58

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Oreochromis niloticus*'da BEYİN DOKUSUNDA FENTHİONUN PİPERONİL BÜTOKSİD MODÜLATÖRLÜĞÜNDE GLUTATYON METABOLİZMASI, HSP70, ASETİLKOLİNESTERAZ AKTİVİTESİ ve LİPİD PEROKSİDASYONUNA ETKİLERİ**

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

Danışman : Prof.Dr. Nevin ÜNER

Yıl 2011 Sayfa:77

Jüri : Prof.Dr. Nevin ÜNER

: Yrd.Doç.Dr. Petek PİNER

: Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER

Bu çalışmanın amacı OP insektisid ve avisid fenthionun sitokrom P450 inhibitörü PBO modülatörlüğünde *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda GSH metabolizmasına, lipid peroksidasyonuna, stres proteinlerine etkisi ve nörotoksik potansiyelini araştırmaktır. Bu amaçla balıklar 24 saat 0.5 mg/L PBO ön uygulamasından sonra 0.567 mg/L fenthion ve 0.5 mg/L PBO içeren suda 24, 96 saat ve 15 gün sürelerle bekletilerek, tGSH, GSH, GSSG ve TBARS miktarları ile GSH/GSSG oranı, GPx, GR ve GST enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle, HSP70 miktarı ELISA test tekniği ile belirlenmiştir.

Fenthionun kısa süreli etkide GSSG ve TBARS miktarlarında artışa, GSH/GSSG oranında ve GST aktivitesinde azalışa; uzun süreli etkide ise tGSH, GSH, HSP70 miktarlarında ve GSH/GSSG oranı ile GR ve GST aktivitelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. PBO varlığında fenthionun, kısa süreli etkide tGSH, GSH miktarlarında ve GSH/GSSG oranında azalışa, GSSG, HSP70 ve TBARS miktarlarında artışa, uzun süreli etkide ise tGSH, GSH miktarları ve GSH/GSSG oranında azalışa, GSSG, HSP70 ve TBARS miktarlarında artışa neden olduğu bulunmuştur. Fenthionun tüm etki sürelerinde AChE inhibisyonuna neden olduğu ve PBO'nun uzun süreli etkide fenthionun AChE inhibisyonu etkisini azalttığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada fenthionun lipid peroksidasyonunu ve HSP70 miktarını artırarak oksidatif strese neden olduğu ve fenthionun bu etkisinin GSH-bağımlı savunma tarafından giderilemediği belirlenmiştir. PBO'nun GSH-bağımlı savunma, lipid peroksidasyonu ve stres proteinlerini etkileyerek fenthionun oksidatif stres etkisini artırdığı bulunmuştur. Fenthionun AChE inhibisyonu ile oluşturduğu nörotoksik etkileri PBO'nun azalttığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenthion, Piperonil Bütoksid, Glutasyon, Stres Proteinleri, *Oreochromis niloticus*

ABSTRACT

MSc THESIS

**EFFECTS of FENTHION on GSH METABOLISM, HSP70,
ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY and LIPID PEROXIDATION
MODULATED by PIPERONYL BUTOXIDE in the BRAIN of *Oreochromis
niloticus***

**Özge TEMİZ
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Nevin ÜNER

Year: 2011 Pages:77

Jury : Prof. Dr. Nevin ÜNER

: Asst.Prof.Dr. Petek PİNER

: Asst.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER

The aim of the present study was to investigate the effects of organophosphorus insecticide and avicide fenthion modulated by PBO, an inhibitor of cytochrome P450, on GSH metabolism, lipid peroxidation, stress proteins and its neurotoxic potential in the brain of juvenile *Oreochromis niloticus*. For this purpose, after the pretreatment of fish with 0.5 mg/L PBO for 24-h, the fish were placed in 0.567 mg/L fenthion and 0.5 mg/L PBO containing water for 24-h, 96-h and 15-d. tGSH, GSH, GSSG and TBARS contents, GSH/GSSG ratio, GPx, GR, and GST enzyme activities were measured using spectrophotometric methods and HSP70 contents were determined by using ELISA test.

It was determined that fenthion caused increases in GSSG and TBARS contents, decreases in GSH/GSSG ratio and GST enzyme activity in short term exposures; increases in tGSH, GSH, and HSP70 contents, GSH/GSSG ratio, GST and GR enzyme activities in long term exposure. It was found that, in the presence of PBO, fenthion caused decreases in tGSH, GSH contents and GSH/GSSG ratio and increases in GSSG, HSP70 ve TBARS contents in short term exposure; decreases in tGSH, GSH contents and GSH/GSSG ratio and increases in GSSG, HSP70 and TBARS contents in long term exposure. It was also determined that fenthion caused AChE inhibition in all exposure durations, and AChE inhibition effect of fenthion decreased by PBO in long term exposure.

In this study, it was shown that the selected concentration of fenthion caused an oxidative stress and this effect of fenthion was not eliminated by the GSH-related defences. PBO increased the oxidative stress effect of fenthion by affecting GSH-related defence, lipid peroxidation and stress proteins. Fenthion caused neurotoxic effects by inhibiting AChE enzyme activity which is decreased by PBO.

Key Words: Fenthion, Piperonyl butoxide, Glutathione, Stress Proteins, *Oreochromis niloticus*

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen tez danıőmanım Sayın Prof.Dr. Nevin ÜNER'e, Sayın Yrd.Doç.Dr. Petek PİNER'e, Sayın Yrd.Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Serbest Radikallerin Oluşumu.....	1
1.2. Antioksidant Savunma Sistemi.....	2
1.2.1. Glutasyon	4
1.3. Isı Şok Proteinleri.....	5
1.4. Lipid Peroksidasyonu.....	7
1.5. Organofosforlu Pestisidler.....	8
1.5.1. Fenthion.....	9
1.5.2. Asetilkolinesterazlar.....	11
1.6. Piperonil Bütoksid.....	11
1.7. Beyin.....	12
1.8. Deney Organizması.....	13
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	15
3. MATERYAL VE METOD.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Kimyasal Maddeler.....	21
3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	23
3.2. Yöntem.....	24
3.2.1.Toksisite Denemeleri	24
3.2.2. Analiz yöntemleri.....	25
3.2.2.1. Total Glutasyon Yöntemi.....	25

3.2.2.2.Okside Glutasyon Yöntemi.....	27
3.2.2.3.Glutasyon Peroksidaz Yöntemi.....	29
3.2.2.4.Glutasyon Redüktaz Yöntemi.....	30
3.2.2.5.Glutasyon S-Transferaz Yöntemi.....	31
3.2.2.6.TBARS Yöntemi.....	33
3.2.2.7.Asetilkolinesteraz Yöntemi.....	34
3.2.3.7.Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	35
3.2.3.8.HSP70 Miktarının Belirlenmesi.....	36
3.2.2. İstatiksel Analiz	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1. Bulgular.....	39
4.1.1. Çözücü Asetonun Parametrelere Etkileri.....	39
4.1.2. Fenthion ve PBO Etkisinde Glutasyon ile İlgili Parametrelerdeki Değişimler.....	41
4.1.2.1. tGSH Miktarındaki Değişimler.....	41
4.1.2.2. GSH Miktarındaki Değişimler.....	41
4.1.2.3. GSSG Miktarındaki Değişimler.....	43
4.1.2.4. GSH/GSSG Oranındaki Değişimler.....	43
4.1.2.5. GPx Aktivitesindeki Değişimler.....	45
4.1.2.6. GR Aktivitesindeki Değişimler.....	45
4.1.2.7. GST Aktivitesindeki Değişimler.....	45
4.1.3. Fenthion ve PBO etkisinde HSP70 Miktarındaki Değişimler.....	47
4.1.4. Fenthion ve PBO etkisinde TBARS Miktarındaki Değişimler.....	47
4.1.5. Fenthion ve PBO etkisinde AChE Aktivitesindeki Değişimler.....	48
4.2. Tartışma.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	59

ÖZGEÇMİŞ.....	77
---------------	----

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi.....	26
Çizelge 3.2. Okside Glutasyon Yöntemi.....	28
Çizelge 3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi.....	30
Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi	31
Çizelge 3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi.....	32
Çizelge 3.6. TBARS Yöntemi.....	33
Çizelge 3.7. Asetilkolinesteraz Yöntemi.....	34
Çizelge 3.8. HSP70 Yöntemi.....	37
Çizelge 4.1. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda asetonun parametrelere etkileri.....	40
Çizelge 4.2. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun tGSH ve GSH miktarına etkileri.....	42
Çizelge 4.3. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun GSSG miktarına ve GSH/GSSG oranına etkileri.....	44
Çizelge 4.4. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun GPx, GR ve GST enzim aktivitelerine etkileri.....	46
Çizelge 4.5. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun HSP70 ve TBARS miktarlarına etkileri.....	48
Çizelge 4.6. <i>O. niloticus</i> ' da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun AChE enzim aktivitelerine etkileri.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 1.1. Enerji transferi sağlanarak oluşmuş farklı ROS türleri.....	2
Şekil 1.2. GSH biyosentezi ve GSH redoks döngüsü.....	4
Şekil 3.1. GSH Standart Grafiği.....	27
Şekil 3.2. Protein Standart Grafiği.....	36
Şekil 3.3. HSP70 Standart Grafiği.....	38

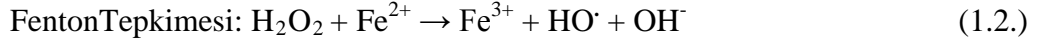
1. GİRİŞ

Dünya üzerinde pestisid çeşitliliğinin ve kullanımının artması, pestisidlerin ekosistem içerisinde ayrılmaz bir parça olmasına neden olmuştur. Deney hayvanları üzerinde yapılan akut ve kronik pestisid uygulamalarında, pestisidlerin toksikolojik ve farmakodinamik özellikleri ile ilgili önemli bilgiler bulunmuştur. Bu araştırmalarda pestisid toksisitesi, enzim aktiviteleri, belirli patolojik değişimler, mutajenik ve karsinojenik özellikler araştırılarak belirlenmektedir (Banerjee ve ark., 1999; EPA, 2002). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda deney hayvanlarında birçok pestisidin reaktif oksijen türleri (ROS) üretme yeteneği ve DNA hasarı oluşturmasına bağlı olarak sitotoksik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir (Castillo ve ark., 2002). Pestisidler, hücrede membrana bağlı enzimlerin ve reseptörlerin değişmesine, membran potansiyelini azaltarak membran bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır (Fang ve ark., 2002).

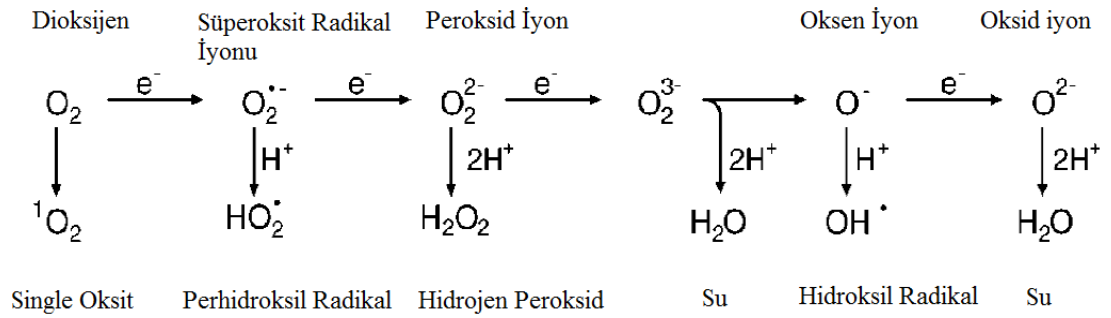
Aerobik organizmalar yüksek enerjili besin bileşiklerinin oksidasyon tepkimeleri yoluyla enerji sağlamaktadır. Bu tepkimeler hücrelerde önemli bir ROS kaynağıdır (Finkel ve Holbrook, 2000; Sohal ve ark., 2002). Canlılar ROS'un zararlı etkilerinden korunmak üzere antioksidant savunma sistemlerini geliştirmişlerdir (Livingstone, 2001; Chauhan ve Chauhan, 2006; Limon-Pacheco ve Gonsebatt, 2009). Canlıda normal koşullarda antioksidant sistem ve ROS denge halindedir. ROS'un fazla üretimi canlıda oksidatif strese neden olur (Chauhan ve Chauhan, 2006).

1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Reaktif oksijen türleri; süperoksid (O_2^-), hidroksil (HO^\bullet), hidrojen peroksid (H_2O_2), alkoksil (RO^\bullet) gibi serbest radikallerden oluşur. O_2^- ilk oluşan serbest radikal olup dismutasyon tepkimeleri ile H_2O_2 radikal olmayan türevlere dönüşmektedir. H_2O_2 metallerin katalizörlüğünde Haber-Weiss ve Fenton tepkimeleriyle yüksek derecede reaktif HO^\bullet radikallerini oluşturur (Chauhan ve Chauhan, 2006; Banvalfi, 2011) (Tepkime 1, 2):



Moleküler oksijenden (O_2) radikal oluşumu valans kabuğundaki elektronlardan kaynaklanmaktadır. Triplet oksijen radikal olmayan atom veya moleküller ile tepkime vererek onları radikallere dönüştürebilir. Moleküler oksijen ise enerji transferleri veya elektron transfer tepkimeleri ile radikal moleküllere dönüşebilir. Enerji transferi ile singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) oluşurken, elektron transfer tepkimeleri ile kademeli olarak $\text{O}_2^{\cdot-}$ radikali, H_2O_2 ve OH^{\cdot} radikalleri oluşur (Apel ve Hirt, 2004).



Şekil 1.1. Enerji transferi sağlanarak oluşmuş farklı ROS türleri (Apel ve Hirt, 2004).

Reaktif oksijen türlerinin hücre içerisinde DNA, proteinler ve lipidler üzerinde hasarlara neden olarak oksidatif stres oluşturduğu bilinmektedir (Wells ve ark., 1997; Wells ve ark., 2009).

1.2. Antioksidant Savunma Sistemi

Aerobik organizmalarda ROS'un neden olduğu hücresel hasarları önleyen antioksidant savunma sistemi iki grupta incelenir. Enzimatik antioksidantlar; süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1), katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9), glutatyon S-transferaz (GST; EC 2.5.1.18) (Ketterer, 2001), glutatyon redüktaz (GR; EC 1.8.1.7)'dir (Kelly, 1998). Enzimatik olmayan antioksidantlar ise askorbik asit (C vitamini), alfa-tokoferol (E vitamini), redükte glutatyon (GSH; L- γ -glutamil-L-sisteinil-glisin), β -karoten (provitamin A), karotenoidler ve flavonoidleri içermektedir (Valko ve ark., 2006).

Antioksidant sistemde metalloenzimlerden biri olan SOD, $O_2^{\cdot-}$ anyonunu indirgeyerek H_2O_2 ve O_2 molekülüne dönüştürmektedir. (Tepkime 3):



Glutasyon peroksidaz ve diğer enzimler 3 farklı ROS çeşidinin H_2O_2 , lipid peroksidler ve peroksinitrit detoksifikasyonunda kullanılırlar. Selenyum bağımlı GPx 4 selenyum atomu içerir ve enzimin aktif bölgesi selenosistein olarak bulunur. Böylece GSH'ın H_2O_2 ile oksidasyonunu hızlandırır; sonuç olarak okside GSH (GSSG) ve su oluşur. (Tepkime 4):



Katalaz yalnızca H_2O_2 'yi substrat olarak kullanıp redüksiyonu sağlayarak su ve O_2 'yi oluşturur. Bu enzim peroksizomlarda ve eritrositlerde bulunur (Laguerre ve ark.,2007). (Tepkime5):



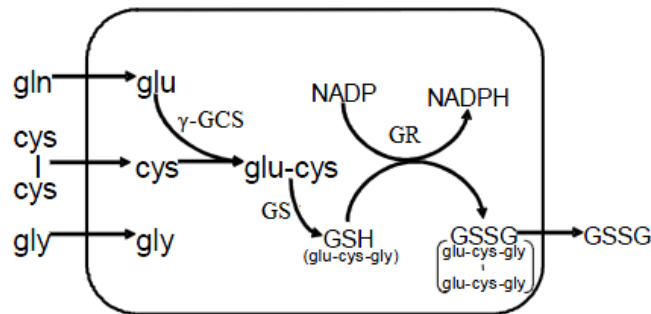
Serbest radikaller vücutta antioksidant savunma mekanizmasının kapasitesini aştıkları zaman çeşitli toksik etkilere yol açabilir (Gutteridge, 1995). Hücre membranındaki yağ asitleri ile tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu (LPO), organizmada bir serbest radikal etkisi sonucu membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen uzaklaştırılmasıyla başlar ve malondialdehit (MDA) düzeyinin artmasına neden olur (Esterbauer ve ark., 1982). LPO oksidatif stresin önemli bir göstergesidir ve antioksidant sistemde düşük moleküler ağırlıklı GSH, oksidatif stres oluşumuna karşı önemli rol almakta ve tüm canlı türlerinde bulunmaktadır (Younes, 1999; Pandey ve ark., 2001).

1.2.1. Glutasyon

Tripeptid yapıda olan GSH hücrede en bol bulunan düşük molekül ağırlığa sahip antioksidant sistem elemanıdır. Sisteinin sülfidril grubu redüksiyon ve konjugasyon tepkimelerinde GSH'ın önemli bir bileşenidir (Forman, 2009). Birçok hücrede GSH derişimi 1-2 mM olduğu halde karaciğer hücrelerinde üretimi fazla olduğundan derişimi 1-10 mM arasında değişmektedir.

Hüresel GSH derişimini düzenleyen birçok enzim vardır (Cnubben ve ark., 2001). γ -Glutamil transpeptidaz (γ -GT; EC 2.3.2.2) enzimi γ -peptid bağıını kırarak hücre içinde GSH oluşumu için gerekli olan γ -glutamil rezidülerini transfer eder. İntraselüler GSH metabolizmasında glutamin (gln), sistin (cys-cys) ve glisin (gly) hücre içerisine alınır. Hücre içerisinde gln ve cys-cys glutamik asit (glu) ve sisteine (cys) dönüştürülür. γ -glutamilsisteinil sentetaz (γ -GCS; EC 6.3.2.2) enzimi ile L- γ -glutamil-L-sistein oluşturulur. Glutasyon sentetaz (GS; EC 6.3.2.3) enzimi aracılığıyla L- γ -glutamil-L-sistein yapısına glisin amino asiti ATP varlığında bağlanarak GSH'ı oluşturur (Van de Poll, 2008). Ökaryotik hücrelerde GSH'ın depolanması 3 yerde yapılır: % 90'ı sitoplazmada, %10'a yakın kısmı mitokondride ve %1'den az kısmı da endoplazmik retikulumda bulunur (Shelly, 2009).

Hücredeki tiyol redoks döngüsünün devamlılığı için GSH önemli bir rol oynar ve GSH; endojen ve eksojen radikallerin detoksifikasyonu, sisteinin taşınması ve depolanması, protein ve DNA sentezi, hücre döngüsü regülasyonu ve hücre farklılaşması gibi tepkimelerde rol almaktadır (Poon, 2004). Ayrıca sitosolik GSH, redoks döngüsünde ROS'a substratı gibi davranarak direkt olarak bağlanıp inaktive edebilmektedir (Knapen, 2000).



Şekil 1.2.GSH biyosentezi ve GSH redoks döngüsü (Van de Poll, 2008).

Glutasyon peroksidaz enzimi yapı olarak selenyum bağımlı ve selenyum bağımlı olmayan olarak 2 gruba ayrılır. Se-bağımlı GPx, H₂O₂ ve organik hidroperoksidleri azaltmaktadır. Se-GPx enziminin 5 farklı (GPx1-5) türü vardır. Se-bağımsız GPx ise yalnızca organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizler. Böylece GPx, oksidatif strese karşı önemli bir rol oynamaktadır. GPx, GSH varlığında ROS'u temizlerken GSH GSSG'ye yükseltgenir. GSSG ise NADPH varlığında GR ile yeniden GSH olarak indirgenir. GSSG'ye NADPH'dan bir elektron aktarılmasıyla redüksiyon gerçekleşir. GR yapısında flavinadenin dinükleotid (FAD) taşımaktadır. Bu enzim sadece GSH indirgenmesinde değil GSH düzeyinin belirli bir seviyede tutulmasında da görev almaktadır (Cnubben ve ark., 2001).

GST toksik bileşiklerin detoksifikasyonunda anahtar rol oynamaktadır, organizmada metabolizma sonucu açığa çıkan toksik bileşikler ile canlıda oluşabilecek hasarları önler (Marss, 1996). GST elektrofilik bileşiklerin farklı türleri ile GSH'nin konjugasyonunu sağlamaktadır. GST'ler tüm ökaryotik ve prokaryotik canlı sistemlerinde; sitoplazmada, mikrozomlarda ve mitokondri içinde bulunur. GST'lerin şimdiye kadar bulunmuş 7 farklı çeşidi vardır. Bunlar; alpha (a), mu (m), pi (p), sigma (s), theta (u), kappa (k) ve zeta (z)'dir. Bu sınıflandırma substrat seçiciliği, amino asit dizilişi ve kinetik enzim davranışına bağlıdır (Landi, 2004).

Hücrede diğer bir savunma sistemi ısı şok proteinlerini de (HSP) içeren stres proteinleridir. Merkezi sinir sisteminde intraselüler redoks döngüsündeki değişimler, ağır metaller, amino asit analogları ve hücre için toksik diğer maddeler HSP sentezini artırmaktadır. Uzun süreli stres koşullarında HSP sentezi ile strese karşı hücrenin toleransı artırılmaktadır (Poon ve ark., 2004).

1.3. Isı Şok Proteinleri

Isı şok proteinleri ilk kez Ritossa (1962) tarafından yüksek ısı etkisinde meyve sineği (*Drosophila busckii*)'nde belirlenmiştir ve ısı şok proteinleri (HSP'ler) olarak tanımlanmıştır. Bu proteinler, başka faktörlerin de etkisi ile sentezlenmelerinden dolayı "stres proteinleri" adını almışlardır (Lewis ve ark., 1999). Bu tanım stresle

indüklenen metalloiyonein ve CYP450 gibi protein gruplarını içerse de terminolojide genellikle HSP'ler için kullanılmaktadır (Iwama ve ark., 1998).

Hücre proteinlerinin %2-5'ini oluşturan HSP'ler, bakterilerden insana kadar tüm organizmalarda bulunan yüksek oranda korunmuş sitoprotektif proteinlerden olup kimyasal ve çevresel faktörlere karşı; nikotin, etanol, ağır metaller, oksidantlar, osmotik stres, amino asit analogları, metabolik değişim, yaşlanma, enfeksiyon, UV, sıcaklık, egzersiz gibi etkenler tarafından indüklenir (Kregel, 2002). Farklı hücresel süreçlerde oluşabilecek olan oksidatif stres gibi patolojik durumlarda ve aşırı ROS üretimi sonucu antioksidant enzim kapasitesinin aşılması gibi durumlarda HSP'ler dengenin yeniden sağlanması için çalışmakta ve hücresel süreçlerde moleküler şaperon olarak görev yapmaktadırlar (Benjamin ve McMillan, 1998; Kalmar ve Greensmith, 2009).

Moleküler şaperon olarak HSP'lerin görevleri; hücrede ilk oluşumlarından itibaren proteinlerin spesifik katlanması, onarımı, değişimi ve hücre membranı üzerinde proteinlerin hareketi ve korunmasıdır (Kalmar ve Greensmith, 2009).

Isı şok proteinleri, hücresel sinyal iletiminin düzenlenmesi, hücresel stres sonucu hücrenin yaşamı ya da ölümüne karar verilmesi, hücrenin kademeli olarak apoptozise uğratılmasında da görev alırlar (Poon, 2004). Bütün bu görevlerinin yanı sıra büyük moleküllü HSP'ler birçok farklı türde bulunduğundan stres indikatörleri olarak, küçük moleküllü stres proteinleri ise türlere spesifik olduğundan tanısal amaçlar için kullanılırlar (Iwama ve ark. 1999).

HSP'ler moleküler büyüklüklerine göre alt sınıflara ayrılırlar, bunlar; düşük molekül ağırlıklı HSP'ler (16-30 kDa), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve büyük molekül ağırlıklı HSP110'dur (Kalmar ve Greensmith, 2009).

HSP70 ailesi ksenobiyotik varlığında hücreleri hasardan koruyan bir protein ailesidir (Sharp ve ark., 1999). İlk olarak proteinlerin kontrolü ve diziliminde görev alır. HSP70 ile belirlenmiş olan yanlış dizilime sahip proteinler proteozom veya lizozomlarda yıkıma uğrar. Böylece hasarlı proteinlerin temizlenmesi HSP varlığında yapılır. Bazı durumlarda ise yanlış katlanmış proteinlerin yeniden düzenli bir şekilde katlanması sağlanarak bunlar kurtarılabilir (Kalmar ve Greensmith, 2009).

HSP70 ailesi, en indüklenabilir HSP grubudur, kemirgenlerde 71 kDa, insanlarda 72 kDa moleküler ağırlıkta bulunmaktadır. Bu grup içerisinde HSC70 (P72; HSC73; Hspa8), indüklenabilir formu olan HSP72 ve yapısal olarak glukoz ve proteinden oluşan endoplazmik retikulumda yer alan GRP75 bulunur (Poon, 2004).

Sinir sisteminde oluşan çeşitli hasarlara karşı HSP70 sentezinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Denatüre olmuş proteinlerin aktive ettiği HSF'ler (ısı şoku transkripsiyon faktörü) ile HSP sentezi indüklenir. Aktif hale geçen HSF'ler fosforile olmuş tridimer formlarıyla çekirdeğe giriş yapar. HSF çekirdeğe girdiğinde stres proteinleri elemanları (HSE) ile birleşerek DNA yapısındaki HSP genlerinin transkripsiyonu sağlanır. HSP70 denatüre proteinlere ATP-bağımlı şekilde bağlanır (Poon, 2004; Franklin ve ark., 2005).

Sucul organizmalarda (alg, rotifer, yumuşakçalar, eklembacaklılar, kabuklular, balık vb.) yapılan toksikolojik çalışmalarda, HSP70 gibi büyük moleküllü stres proteinlerinin genelde protein denatürasyonuna sebep olan toksik maddelere hücresel düzeyde verilen tepkinin biyomarkırları olduğu ortaya konmuştur (Currie ve Tufts, 1997; Deane ve Woo, 2005).

1.4. Lipid Peroksidasyonu

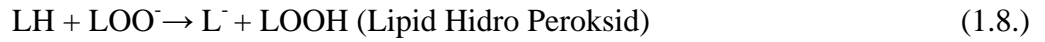
Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) hidrojen zengin metilen grupları (CH₂) içerir. PUFA'nın ROS saldırısına uğramasıyla zincirleme tepkimeler başlar ve peroksil radikalleri oluşur. Bu zincirleme tepkimeler lipid peroksil (LOO[•]) radikallerinin ayrımı ile karbon zinciri uzunlukları farklı çeşitli aldehit grupları oluştururlar. Bu tepkimeler sonucu oluşan son ürün, ROS'dan daha kararlı yapıdadır (Poon, 2004).

Lipid peroksidasyon süreci bir dizi zincir tepkime ile başlatılır. Bir yağ molekülünün peroksidasyonu; inisiyasyon, degradasyon ve terminasyon tepkimelerini içerir.

İnisiyasyon evresi: HO[•] radikali, bir lipid substratından (LH) bir hidrojen atomu (H⁺) kopararak bir lipid radikali (L[•]) oluşturur.

Degradasyon evresi: Zincirleme tepkimeye giren lipid radikaline O₂ eklenir LOO[•] ile lipid peroksit oluşur.

Terminasyon evresi: Antioksidantlar ile zincir tepkime son bulur ve stabil son ürün oluşur (Porter ve ark., 1995). (Tepkime 8,9,10) ;



Lipid peroksidasyonu sürecinde zincirleme tepkimelerin sonucu lipid alkolsil radikaller (LO[•]), malondialdehid (MDA; HOC-CH₂-CHO) gibi aldehidler, alkanlar, lipidepoksidler ve alkoller oluşur. Bu ürünlerin çoğu toksiktir (Sole ve ark.,1990).

Dokularda hasar oluşturan ROS'un hücre üzerinde etkisinin araştırılmasında biyomarkır olarak lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) oluşma miktarı ölçülmektedir. MDA miktarı tiyobarbitürik asit tepkimesi ile ölçülebilir (Valavadinis ve ark., 2006).

1.5. Organofosforlu Pestisidler

Organofosforlu pestisidler (OP), genellikle esterler, amidler veya fosfonik asidin tiyol türevleridir ve biyolojik özelliklere sahip kimyasal ajan gruplarının bir formudur (Karalliedde, 1999).

Organofosforlu pestisidler fosfat, tiyo, ditiyofosfat ve organik kısımdan oluşmaktadır. Çoğu durumda fosfat kısmı yerine dialkil grubu bağlanmaktadır. Organofosforlu pestisidler biyolojik etkilerini, beyin ve diğer dokuların hücrenel bileşenlerine özellikle metabolitlerine ayrılıp elektrofilik saldırı yaparak gösterdiği öne sürülmektedir. Nörotoksisite birçok pestisitinin ortak karakteristiğidir (Fang ve ark., 2002). Omurgalılarda OP'ler fosforlu yapısından sağlanan fosforik asitle etki gösterir ve canlıda kas dokusunda en çok bulunan asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), plazma ve karaciğerde en çok bulunan butirilkolinesteraz (BChE; EC

3.1.1.8), plazma ve hepatik karboksilesterazlar (aliesteraz), paraoksonazlar ve diğer atipikesterazların inhibisyonunu sağlar. AChE inhibisyonu OP'lerin toksisitesi için en çok araştırılan biyomarkırdır (Abdollahi, 2004).

Birçok OP bileşiğinin yapısında fosfora çift bağlı sülfür atomu vardır. Toksik hale gelmeleri için metabolik aktivasyon ile oksonlara dönüşmeleri gerekir. Oksidatif desülfürasyon olarak adlandırılan ve karaciğerde mikrozomal CYP450 enzimleri tarafından katalizlenen bu biyotransformasyon tepkimesi sonucunda OP bileşiği toksik hale gelir (Jokanovic, 2001).

1.5.1. Fenthion

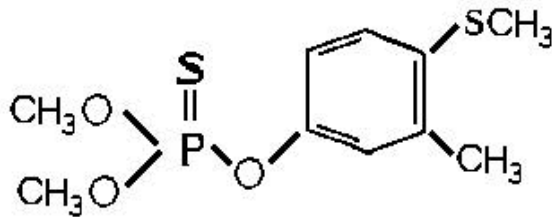
Fenthion, tarımda ve çiftlik hayvanları üzerinde ektoparazitlere karşı yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu OP avisid ve insektisiddir (Roberts ve Hudson, 1999). Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Örgütü, ABD-EPA) tarafından sınırlı üretimi olan pestisidler içerisinde yer almaktadır (EPA, 2001). Oktanol/su partiyon katsayısı ($\log K_{ow}$) 4.09'dur (Lambropoulou ve Albanis, 2002). Bir bileşiğin oktanol-su partiyon katsayısı, o bileşiğin belirli bir sıcaklıktaki lipofilitesinin bir ölçüsüdür. $\log K_{ow}$ değeri 3'den küçük olan bileşikler hidrofilik, $\log K_{ow}$ değeri 4'ün üzerinde olan bileşikler ise lipofilik karakterlidirler (Noble, 1993).

Moleküler formülü: $C_{10}H_{15}O_3PS_2$

Moleküler ağırlığı: 278.3kDa

Kimyasal Formülü: IUPAC adı: *O,O*-Dimethyl-*O*-[3-methyl-4-methylsulfanyl] phenyl] phosphorothioate

Kapalı Formülü:



(1.9.)

Ticari adları: MPP, mercaptophos, OMS 2, ENT 25540, Bay 29493, Baycid, Baytex, Dalf, DMTP, Entex, Lebaycid, Mercaptophos, Prentox Fenthion 4E, Queletox, Spotton, Talodex, Tiguvon.

Buhar Basıncı: 4 mPa (20°C'de), 10 mPa (30°C'de)

Oktanöl/su partiyon katsayısı: $\log K_{OW} = 4.09$

Sudaki çözünürlüğü: 2 mg/L (20°C'de)

Erime Noktası: 7.5°C

Kaynama Noktası: 87 °C (0.01 mm Hg'da)

Hidroliz: pH 7'de ve 25 °C

Kimyasal Grup: Organofosforlu bileşik

OPP Kimyasal Kodu:053301 (EPA, 2001;www.abcbirds.org)

Bitkiler ve hayvanlarda beş farklı fenthion metaboliti izole edilmiştir; fenthion sülfoksid, fenthion sülfon, fenthion okson, fenthion okson sülfoksid, fenthion okson sülfon. Bu metabolitler ana bileşikten daha yüksek toksisite göstermektedir (Cabras ve ark., 1993; Molinari ve ark., 1998).

Fenthionun sürüngen, kuş ve balıklarda yapılan histopatolojik testlerde kronik uygulamada toksik etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Mullie ve ark., 1999; Zutshi ve Murthy, 2001).

Fenthion, AChE enzimini inhibe ederek kolinerjik sinapsların post sinaptik zarlarının kalıcı depolarizasyonuna ve sonunda hayvanların felç olmasına ve ölümüne neden olur (Costa, 2006). Fenthion okson formuna kolayca dönüşmediği için daha güvenli bir pestisid olarak geliştirilmiştir (Roberts and Hutson, 1999). Bununla birlikte *Carassius auratus*'da fenthionun okson formuna dönüşerek yüksek derecede toksik etki yarattığı bulunmuştur (Kitamura ve ark., 2000). ABD-EPA tarafından verilen toksisite sınıflandırmasının ikinci grubunda yer alan fenthion, orta derecede toksik bir bileşiktir (EPA, 2001). Bayer firmasının üretim ve kullanımdan kaldırılması isteği ABD-EPA tarafından uygun görülerek 30 Kasım 2004 tarihiyle fenthion kullanımı yasaklanmıştır (EPA, 2006a). Çukurova Bölgesi'nde zeytin ve buğday üretiminde zararlılara karşı 2008 yılında 99.975L, 2009 yılında 3.263L ve 2010 yılında 83.570L fenthion kullanılmıştır. Fenthion imalatı ve fiili ithalatı 30 Haziran 2010 tarihi itibarıyla Türkiye genelinde yasaklanmıştır. Stokların

kullanımına 31 Ağustos 2011 tarihine kadar 14 ay süreyle müsaade edileceği bildirilmiştir (Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Adana Bitki Koruma Şube Müdürlüğü, Çukurova Bölgesi pestisid 2008-2010 satış raporları sonuçları).

1.5.2. Asetilkolinesteraz

Kolinesterazlar genellikle AChE ve BChE olarak iki büyük sınıfa ayrılmaktadır. Balık beyin ve kaslarında genellikle AChE, karaciğer ve plazmada ise BChE daha fazla bulunur (Fulton ve Key, 2001). AChE nörotransmitter bir madde olarak görev yapan asetilkolinin (ACh) kolin ve asetik asite hidrolizinden sorumlu bir enzimdir (Vale, 1998; Pope ve ark., 2005). AChE aktivitesinin engellenmesi durumunda parasempatik ve sempatik motor sinirler ve merkezi sinir sistemi çalışmasında aksaklıklar oluşur (Lotti, 1995).

Organofosforlu pestisidler, enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsü ile kovalent bağ kurmaları sonucunda nörotransmitterin doğal katabolizmasını engellemek üzere inhibisyon yaparlar (Galgani ve Bocquené, 2000; Dailianis ve ark., 2003). ACh birikimi sonucu, sinapslar ve nöromuskular kavşaklarda aktivasyon artıp sonuçta kolinerjik sistem uyarısı yoğunlaşmaktadır (Soreq ve Zakut, 1993; Hazarika ve ark., 2003; Tuovinen, 2004).

Farklı ksenobiyotiklerle çalışılarak AChE inhibisyonu çeşitli türlerde gösterilmiştir (Pan ve Dutta, 1998). Akuatik kirlenmede AChE aktivitesi biyomarkır olarak kullanılmaktadır (Dembele ve ark., 2000).

1.6. Piperonil Bütoksit

Piperonil bütoksit (PBO; IUPAC adı; 5-[2-(2-butoxyethoxy)ethoxymethyl] -6-propyl-1,3-benzodioxole; CAS Numarası 51-03-6) zararlı kontrolünde piretroid sinerjisti olarak kullanılmaktadır. PBO piretroid esterlerinin etkisini 10 kata kadar artırmaktadır (Casida ve ark., 1983). Bu etki, PBO'nun karmaşık işlevli oksidazları inhibe etme ve birçok mikrozomal metabolizmayı engelleme temeline dayanmaktadır

(Hodgson ve Levi, 1998). PBO bazı OP'lerin aktivasyonu sırasında Faz I biyotransformasyon enzimlerini inhibe etmektedir (Li ve ark, 2007).

Piperonil bütoksit, geçtiğimiz 10 yıl içerisinde yeni pestisidlerin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bugün ABD'de kaydedilmiş 1500 üründe aktif madde olarak PBO bulunmakta ve tarım, sanayi, yaşam alanları ve ticari olarak pek çok uygulamalarda sinerjistik olarak kullanılmaktadır (EPA, 2006b). PBO, CYP450 inhibisyonuna neden olduğu için toksik etkiyi artırmak amacıyla bazı OP pestisidlere de sinerjistik olarak eklenmektedir (Siegfried ve Scharf, 2001).

Organizmada elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunda 3 farklı enzim grubuyla oluşturulan ortak faz bulunmaktadır. Faz I tepkimeleri sitokrom P450 (CYP450; EC 1.14.14.1) monooksijenaz enzim gruplarını içerir. GST gibi faz II detoksifikasyon enzimleri için Faz I tepkimelerinde yükseltgenme, indirgenme ve hidroliz gibi tepkimeler gerçekleşir ve substrata aktif gruplar eklenir, böylece faz II konjugasyon tepkimelerine substrat hazırlanır. Faz II'de konjugasyon tepkimeleri sülfat, asetat, glukuronik asit, GSH ve glisin gibi endojen maddeler ile gerçekleşir. Bu yolla ara metabolitlerin hidrofilik özellikleri artırılır ve böbrek veya gastrointestinal sistemden atılımları sağlanır. Organizmalarda faz I ve faz II enzimlerinin spesifik substratlara uygun çok sayıda izoformları bulunmaktadır. Faz III tepkimelerinde görev alan enzimler ise ATP-bağımlı membran pompaları ile parçalanmış toksikantları tanır ve membran dışına atılımı sağlar (Marss, 1996).

1.7. Beyin

Omurgalı canlılarda enerji metabolizmasının tüm organlar içerisinde en duyarlı ve karmaşık işleyişi beyin de görülür. Beyine kan geçişi sırasında kan-beyin engeli (BBB) olarak bilinen yapı beyine kanla geçen maddelerin transfer oranını sınırlar. Beyin dokusu omurgalı canlılarda primatlar hariç toplam vücut ağırlığının %1'ini oluşturur. Fakat sıcakkanlı omurgalılarda toplam vücut enerjisinin %1.5-%8.5 arasında enerji kullanımı yaparken soğukkanlı omurgalılarda ise %2.7-%3.4 kadar vücut toplam enerjisini kullanmaktadır. Omurgalı hayvanlarda, hayati ve aktif organlarından biri olan beyin bilimsel çalışmalarda kullanılması biyolojik değişim

süreçlerinin gözlemlenmesine katkı sağlamaktadır (Soengas ve Aldegunde, 2002). Özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek ve nöral hücre yenilenmesi olmayan beyinde toksisite ağır hasarlara neden olabilmektedir (Gupta ve ark, 1998).

Pestisidler, yağlı dokularda birikerek PUFA peroksidasyonuna neden olurlar. Bu durum, özellikle lipid içeriği ve oksijen gereksinimi yüksek olan sinir hücrelerinde dönüşümsüz hasarlara neden olabilir (Gupta ve ark., 1998). Nöronlarda GSH üretme kapasitesinin düşük olmasından dolayı beyinde ROS detoksifikasyonu belirli sınırlar içerisinde yapılır. Bu nedenle nöronlar ROS artışından en çok etkilenen hücrelerdir (Chauhan ve Chauhan, 2006).

1.8. Deney Organizması

Omurgalıların en büyük sınıfı olan balıklar, deneysel olarak çok yönlü kullanılabilen, kısa veya uzun süre yaşayabilen türlerden oluşan bir sınıftır. Araştırmalarda omurgalı hayvanlar arasında balık türlerinin kullanılması evrimsel süreçte geçiş canlısı olması ve ekolojik olarak insan tarafından doğrudan yada dolaylı enerji kaynağı olarak kullanılması model organizma olmasını sağlamıştır (Gerhard, 2007). Balık araştırmaları, balıklarla memelilerin oksidatif strese karşı benzer toksikolojik ve adaptif yanıtlar verdiğini göstermiştir, balıklar oksidatif stresin anlaşılmasında model organizmalardır (Kelly ve ark.,1998). Pestisidlerin balık dokusu tarafından metabolik sürece dahil edilmesi ile bazı fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerinin bozulduğu saptanmıştır (Durmaz ve ark., 2006). Balıklarla yapılan farklı çalışmalarda pestisid kirlenmesiyle oluşan AChE inhibisyonu dışında enzimlerin denatürasyonu (Szabo ve ark.,1992), hormonlardaki değişimler (Guhathakurta ve Bhattacharya, 1988), kas yapısındaki protein azalışı ve RNA sentezinin azalması gibi etkiler görülmektedir (Das ve Mukherjee, 2000).

Tatlı su çuprası (*Oreochromis niloticus*) dünya genelinde dağılım gösteren kemikli bir balıktır ve bu nedenle su ekosistemlerinin incelenmesinde ve toksikolojik araştırmalarda iyi bir model oluşturur. Yapılan araştırmalar *O. niloticus*'un biyotik ve abiyotik stresi tolere edebilen güçlü bir immün sisteme sahip olduğunu göstermiştir (Casas ve ark., 2007).

O. niloticus sucul çevrelerde OP kirleticilerin gözlenebilmesi için kullanılmakta; kronik OP ve karbamat kirliliğini izleme programları için iyi bir deney canlısı olarak dikkate alınmaktadır (Dembele ve ark., 2000).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ksenobiyotikler serbest radikal oluşturarak oksidatif strese neden olabilmekte (Pena-Llopis ve ark., 2003; Rehman ve ark., 2006) ve toksikolojik araştırmalarda GSH metabolizmasındaki değişikler ve lipid peroksidasyonu oksidatif stres markırı olarak değerlendirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003; Üner ve ark., 2008). Ksenobiyotik kontaminasyonu ile oluşan hücrenel düzeydeki biyolojik farklılıklar biyomarkırların etkileşimi ile belirlenir. Sucul organizmalarda yapılan araştırmalarda en çok balıklar üzerine kirleticilerin etkileri araştırılmaktadır (Klaper ve ark., 2006).

Carassius auratus'da piretroid pestisid deltamethrin etkisinde karaciğer dokusunda, GSH ve MDA miktarı ile GPx, GR ve GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Dinu ve ark., 2010). *Channa punctatus*'da piretroid pestisid deltamethrin etkisinde karaciğer, böbrek ve solungaçlarda GSH ve TBARS miktarının; karaciğer ve böbrek dokusunda GST ve GPx aktivitesinin artış gösterdiği bildirilmiştir (Sayeed ve ark., 2003). *O. niloticus*'da herbisid oxyfluorfen etkisinde karaciğer dokusunda GR ve GST enzim aktivitesi aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (Peixoto ve ark., 2006). *O. niloticus*'da herbisid paraquat etkisinde karaciğer dokusunda GST ve GR aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Figueiredo-Fernandes ve ark., 2006). Balıklarda ektoparazit kontrolünde kullanılan diflubenzuron etkisinde *Prochilodus lineatus* 'da karaciğer dokusunda GST aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Maduenho ve Martinez, 2008).

OP dichlorvos etkisinde *Cyprinus carpio*'da beyin dokusunda GSH miktarının arttığı bildirilmiştir (Hai ve ark., 1997). OP quinalphos etkisinde sıçan karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu ile GSH miktarının ve GST aktivitesinin değişmediği, bununla birlikte beyin GST aktivitesinin doza bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. GR aktivitesinin karaciğerde arttığı, beyinde azaldığı, GPx aktivitesinin ise karaciğerde azaldığı, beyinde değiştirmediği bildirilmiştir (Dwivedi ve ark., 1998). *O. niloticus*'da OP diazinon etkisinde 30 gün sonunda karaciğer ve kas dokusunda tGSH miktarının azaldığı ve 7 günlük depurasyon sonunda tekrar kontrol düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir (Elnwshy ve ark., 2007). *Brycon cephalus*'da OP metil parathion etkisinde solungaç, kas ve karaciğer dokularında

GSH miktarının azaldığı, GST aktivitesinin arttığı, GPx aktivitesinin kas dokusunda azaldığı karaciğer dokusunda ise değişmediği belirlenmiştir. Lipid hidroperoksid düzeyinin kas ve solungaç dokularında artış gösterdiği bulunmuştur (Monteiro ve ark., 2009).

Tez çalışmasında kullanılan OP fenthionun *O. niloticus* ve *C. carpio*'da farklı dokularda GSH ve GSH bağımlı antioksidant sistemi ve lipid peroksidasyonunu etkileyerek oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir.

O. niloticus'da beyin dokusunda 0.45 mg/L (%20 LC₅₀) fenthion etkisinde GSSG miktarının, GSH/GSSG oranının ve GPx aktivitesinin arttığı (Piner ve ark., 2007), karaciğer dokusunda tGSH ve GSSG miktarının ve GPx aktivitesinin azaldığı, GST aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. Böbrek dokusunda ise tGSH ve GSH miktarları ile GST aktivitesinde azaldığı belirlenmiştir (Sevgiler ve ark., 2010). *C. carpio*'da 1.73 mg/L (% 80 LC₅₀) fenthion etkisinde karaciğer dokusunda tGSH ve GSH miktarı ile GSH/GSSG oranının azaldığı, TBARS miktarının arttığı; beyin dokusunda ise GSH miktarı, GSH/GSSG oranı ve GST aktivitesinin arttığı, GSSG ve TBARS miktarının azaldığı belirlenmiştir (Sevgiler ve ark., 2007). *C. carpio*'da 0.43 mg/L (% 20 LC₅₀) fenthion etkisinde tGSH ve GSH miktarının azaldığı, GSH/GSSG oranı ve GST aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Üner ve ark., 2008).

Organofosforlu pestisidlerin toksik etkileri enzimin aktif bölgesindeki serin rezidüsü ile kurulan kovalent bağ sonucu AChE inhibisyonu ile nörotansmitterin doğal katabolizmasının engellenmesiyle gerçekleşir (Dailianis ve ark., 2003). OP pestisidlerin farklı balık türlerinde çeşitli dokularda AChE inhibisyonunu gösteren çok sayıda laboratuvar çalışması bulunmaktadır.

O. niloticus'da OP diazinonun karaciğer, solungaç ve kas dokularında AChE inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Durmaz ve ark., 2006). Diazinon etkisinde *Micropterus salmoides*'de beyin dokusunda AChE aktivitesinin derişime bağlı olarak inhibe olduğu belirlenmiştir (Pan ve Dutta, 1998). *O. niloticus*'da trichlorfon etkisinde solungaç dokusunda AChE aktivitesinde azalma belirlenmiştir (Guimaraes ve ark., 2007). *Danio rerio*' da beyin dokusunda OP metil parathion etkisinde AChE aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Huang ve ark., 2011). *O. niloticus*'da OP metil parathionun plazma AChE ve BChE

inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Barbieri ve Ferreira., 2011). Fenthionun *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında AChE ve BChE inhibisyonuna, beyin dokusunda ise AChE inhibisyonuna neden olduğu ve BChE belirlenemediği bildirilmiştir (Üner ve ark., 2010).

Kimyasal inhibitör ya da indükleyicilerin kullanımı ksenobiyotik metabolizması ve ksenobiyotiklerin toksik etkilerinin araştırılmasında en önemli stratejilerden biridir (Ankley ve ark., 1991; El-Merhibi ve ark., 2004; Piner, 2009). Pestisidler ile birlikte sinerjist olarak kullanılan PBO sitokrom P450 ile nonspesifik esterazların kuvvetli bir inhibitörüdür. Tez çalışmasında fenthion toksisitesinin araştırılmasında kullanılan PBO'nun, pestisid toksisitesine etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır;

Ceriodaphnia dubia, *Daphnia magna* ve *D. pulex*'de metabolik olarak aktive edilen ve aktive edilemeyen 7 organofosforlu pestisidin toksisitesine PBO'nun etkisi 48 saat LC₅₀ değerleri belirlenerek araştırılmıştır. PBO ile metabolik olarak aktive edilen parathion, metil parathion, diazinon ve malathionun birlikte uygulanması pestisidlerin toksisitesini azaltırken, metabolik olarak aktive edilmeyen dichlorvos, chlorfenvinphos ve mevinphosun birlikte uygulanmasında pestisidlerin toksisitesinin etkilenmediği belirlenmiştir (Ankley ve ark., 1991). *C. dubia* ve *Xenopus laevis*'de PBO'nun chlorpyrifos toksisitesine etkisi 48 saat LC₅₀ değeri ve AChE enzim aktivitesi ölçümü ile araştırılmıştır. PBO, her iki türde de chlorpyrifos toksisitesini azaltmıştır ve AChE aktivitesinde başlangıçta artış, devam eden süreçlerde azalış ile bifazik bir etki belirlenmiştir (El-Merhibi ve ark., 2004).

Salvelinus fontinalis ve *Salmo trutta*'da sentetik piretroid permethrin, sumithrin ve resmethrinin ayrı ve PBO ile kombinasyonları uygulanmıştır. PBO'nun bu pestisidlerin letal ve subletal etkilerini artırarak toksik yanıtın ortaya çıkma süresini hızlandırdığı belirlenmiştir (Paul ve ark., 2005). *O. niloticus*'da malathion toksisitesine PBO'nun sinerjistik ve koruyucu etkisi araştırılmıştır. PBO'nun malathionun subletal ve akut toksisitesini iki kat azalttığı ve toksik etkideki bu azalmanın bu türde CYP1A, CYP2B ve CYP3A'nın görev aldığı bir mekanizma ile olmadığı belirlenmiştir (Pathiratne ve George, 1998).

Farelerde 52 hafta süreyle oral yolla uygulanan PBO'nun dişi ve erkek farelerde karaciğer kanserine neden olduğu belirlenmiştir (Takahashi ve ark., 1997). PBO'nun sıçan karaciğerindeki kanser mekanizması ve oksidatif stresle olan ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada karaciğer mikrozomlarında ROS miktarı, karaciğerde oksidatif stres metabolizmasıyla ilgili NADPH dehidrojenaz, UDP glukuronil transferaz, GPx, GR gen ekspresyonları belirlenmiştir. PBO'nun ROS oluşturarak oksidatif stresi indüklediği ve oksidatif DNA hasarını artırarak karaciğerde tümör oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Muguruma ve ark., 2007). Sıçan beyin dokusunda fenthion, lambda-cyhalothrin ve PBO (%25 fenitrothion; %2.5 lambda cyhalothrin; %6 PBO) karışımının derişim ve süreye bağılı olarak TBARS miktarını artırdığı; GSH miktarı, GST ve AChE enzim aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (El-Demerdash, 2011).

Laboratuvar çalışmalarında çeşitli çevresel kirleticilerin omurgalı ve omurgasız canlı türlerinde HSP miktarında azalış ve artışlara neden olduğu belirlenmiştir;

Macrobrachium malcolmsonii'de organoklorlu insektisid endosulfan etkisinde solungaç dokusunda HSP70 miktarının artış gösterdiği, karbamatlı insektisid carbaryl etkisinde değişmediği belirlenmiştir (Selvakumar ve ark., 2005). Civa etkisinde *Oncorhynchus mykiss*'de HSP70 miktarında artış belirlenmiştir (Williams ve ark., 1996). Piretroid insektisid esfenvalerate etkisinde *Oryzias latipes*'de HSP60 ve HSP90 miktarı zamana ve derişime göre artış göstermiştir. HSP70 miktarının ise tüm gruplarda artış bulunmuştur (Werner ve ark., 2002).

D. rerio embriyo ve larvalarında 3,4-dichloroaniline ve diazinon uygulamalarında HSP70 miktarının artış gösterdiği belirlenmiştir (Scheil ve ark., 2009). *D. rerio* larvalarında nikel klorid ve chlorpyrifosun birlikte ve tek uygulamalarında HSP70 düzeyinde artış bulunmuştur (Scheil ve ark., 2010). Sentetik piretroid deltamethrin etkisinde *O. mykiss*'de kas dokusunda HSP70 gen ekspresyonunu artırdığı belirlenmiştir (Atamanalp ve Erdoğan, 2010). *O. mykiss*' de kas, karaciğer, solungaç ve böbrek dokularında deltamethrin etkisinde HSP70 gen ekspresyonunda artış bulunmuştur (Ceyhun ve ark., 2010). *O. mossambicus*' da organoklorlu insektisid DDT ve ağır metaller bakır, kadmiyum, krom ve nikel

etkisinde HSP70 ve HSP74, HSP76 izoformlarının karaciğer dokusunda artış gösterdiği bildirilmiştir (Mlambo ve ark., 2010).

Tez çalışmasında OP insektisid ve avisid fenthionun CYP450 inhibitörü PBO modülatörlüğünde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu, stres proteinlerine etkileri ve nörotoksik potansiyeli araştırılmıştır. GSH metabolizmasına etkileri; tGSH, GSH, GSSG miktarları, GSH/GSSG oranı, GPx, GR, GST enzim aktiviteleri belirlenerek, stres proteinlerine etkileri HSP70 miktarı, lipid peroksidasyonuna etkileri TBARS miktarı, nörotoksik etkileri ise AChE enzim aktivitesi belirlenerek araştırılmıştır. GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu ve stres proteinlerdeki değişimler belirlenerek antioksidant sisteme etkileri ve oksidatif stres oluşturma potansiyelleri, AChE aktivitesine etkileri belirlenerek nörotoksik potansiyelleri aydınlatılmıştır.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyali olan juvenil *O. niloticus* örnekleri Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınmıştır. Laboratuvara getirilen örneklerin, dinlendirilmiş musluk suyu içeren ve merkezi sistemle havalandırılan cam akvaryumlarda iki hafta süreyle laboratuvar koşullarına uyumları sağlanmıştır. Suyun özellikleri: sıcaklık $19.65 \pm 0.57^\circ\text{C}$, çözülmüş oksijen 6.71 ± 0.63 mg/L, alkalinite 240 ± 3.53 mg/L CaCO_3 , toplam sertlik 268 ± 12.54 mg/L CaCO_3 , pH 7.83 ± 0.9 . Laboratuvar sıcaklığı $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de tutulmuş ve 12 saat aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Balıklar günde iki kez aynı saatlerde ağırlıklarının %3'ü kadar hazır sazan yavru balık yemi ile beslenmiştir (BioAqua, Çamlı Yem, İzmir, Türkiye). Toksikite denemelerinde 13.6 ± 1.56 g ağırlık ve 9.37 ± 0.5 cm boyda balıklar ile çalışılmıştır.

Pestisid olarak denemelerde CAS Numarası 55-38-9, IUPAC adı: *O,O*-dimethyl-*O*-[3-methyl-4-(methylsulfanyl)phenyl] phosphorothioate olan fenthionun ticari formülasyonu Lebaycid EC50, Bayer (Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd. Şti., 525 g/L) kullanılmıştır.

3.1.1. Kimyasal Maddeler

1-Butanol		Merck
1-Kloro-2,4-Dinitro-Benzen	CDNB	Sigma
2-Tiyobarbitürik Asit	TBA	Merck
2-Vinilpiridin	2-VP	Aldrich
5,5'-Ditiyo-bis(2-Nitrobenzoik Asit)	DTNB	Sigma
5-Sülfosalisilik Asit		Sigma
Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody		Sigma
Aprotinin		Fluka
Asetik Asit	CH_3COOH	Riedel-deHaen

Aseton	CH_3COCH_3	Carlo Erba
Asetilkolintiyoiyodür		Sigma
Bakır Sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sigma
di-Potasyum Hidrojen Fosfat	K_2HPO_4	Merck
di-Sodyum Adenozin5'-Trifosfat	Na_2ATP	Sigma
di-Sodyum Hidrojen Fosfat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck
Etilen DiaminTetra asetik Asit	EDTA	Sigma
Etopropazin		Sigma
Folin-Ciocalteu's Fenol Ayıracı		Sigma
Glutasyon redüktaz	GR	Sigma
Heat Shock Protein 70		Sigma
Magnezyum Klorür	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
Monoclonal Anti-HeatShock Protein 70 Clone BRM 22		Sigma
Okside L-Glutasyon	GSSG	Sigma
<i>o</i> -Fenilen Diamin Dihidroklorid	OPD	Sigma
Piperonil Bütoksid	PBO	Sigma
Piridin		Merck
Potasyum Dihidrojen Fosfat	KH_2PO_4	Merck
Potasyum Klorür	KCl	Merck
Redükte L-Glutasyon	GSH	Sigma
Sığır Serum Albumini	BSA	Sigma
Sodyum Azid	NaN_3	Sigma
Sodyum Dihidrojen Fosfat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
Sodyum Dodesil Sülfat	SDS	Sigma
Sodyum Hidroksit	NaOH	Merck
Sodyum Karbonat	Na_2CO_3	Merck
Sodyum Klorür	NaCl	Merck
Sodyum Potasyum Tartarat		Merck
Sülfirik asit	H_2SO_4	Merck
Sükroz		Sigma

<i>t</i> -Bütilhidroperoksit		Sigma
Tiyobarbiturik asit	TBA	Merck
Tris Baz		Sigma
Tris hidroklorid	TrisHCl	Sigma
Tween-20		Sigma
β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat	β -NADPH	Sigma

3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler

1. Analitik Terazî	Sartorius CP-224S
2. Benmari	Memmert WB 22
3. Buz Makinası	Scotsman AF 20
4. Çalkalamalı İnkübatör	EdmundBuhler
5. Derin Dondurucu	Sanyo Ultra Low
6. Distile Su Cihazı	Şimşek Labor teknik SS-200
7. Homojenizatör	Janke&Kunkel Ultra-Turrax T25
8. Oksijenmetre	Orion 5-Star Multimeter
9. Otomatik Pipetler	Gilson, Eppendorf, Biohit
10. pH metre	Hanna Instruments PH 211
11. Sealing Film	Sigma
12. Soğutmalı Santrifüj	Sigma 16 K
13. Santrifüj	Hettich EBA 8S
14. Terazî	Sartorius BP-310S
15. UV-Visible Spektrofotometre	Shimadzu UV Mini 1240
16. Vorteks	Janke&Kunkel VF-2
17. Mikroplaka Okuyucu	Varion 50-Bio UV-Visible
18. 96 kuyucuklu mikroplakalar	Corning, Bio-Rad

3.2. Yöntem

3.2.1. Toksikite Denemeleri

Toksikite denemelerinde kullanılan fenthion ve PBO'nun derişimleri ön denemelerle belirlenmiştir. Bu amaçla ön denemelerde 0.5 mg/L ve 1 mg/L PBO, fenthionun daha önce belirlenen 96 saatlik LC₅₀ değerin ¼'ü olan 0.567 mg/L (Piner, 2005) ile birlikte aynı akvaryum içerisine ayrı ayrı suya karıştırılarak 15 gün süreyle uygulanmıştır. PBO'nun fenthion ile birlikte uygulanması sonucu ölüm gözlenmeyen 0.5 mg/L derişimi ana denemelerde kullanılmıştır. PBO için çözücü olarak aseton kullanılmıştır. Toksikite denemelerinde kullanılan çözücü derişiminin 0.5 mg/L'yi aşmaması gerektiği bildirilmiştir (APHA, AWWA, WEF, 1998); bu nedenle kullanılan aseton derişimi 0.36 mg/L olarak ayarlanmıştır. Denemelerde kullanılan çözeltiler günlük olarak hazırlanmıştır.

Toksikite denemeleri 130L'lik 5 cam akvaryumda kontrollü olarak yürütülmüştür. Her akvaryuma 18 balık yerleştirilmiş ve gruplar aşağıdaki şekilde ayarlanmıştır:

Kontrol Grubu: Balıklar dinlendirilmiş musluk suyu içeren akvaryumlarda bekletilmiştir.

Çözücü Kontrol Grubu: Balıklar 0.36 mg/L aseton içeren akvaryumlarda bekletilmiştir.

Fenthion Grubu: Balıklar 0.567 mg/L fenthion içeren akvaryumlarda bekletilmiştir.

PBO Grubu: Balıklar 0.5 mg/L PBO içeren akvaryumlarda bekletilmiştir.

Fenthion + PBO Grubu: Balıklar 0.567 mg/L fenthion ve 0.5 mg/L PBO içeren akvaryumlarda bekletilmiştir.

PBO ve fenthion+PBO uygulanan gruplara 24 saat PBO ön uygulaması yapılmıştır.

Toksikite denemeleri süresince balıklar her gün taze hazırlanmış toksikant içeren akvaryumlara aktararak su değişimi sağlanmıştır. Balıklar günde iki kez aynı

saatlerde ağırlıklarının %3'ü kadar hazır sazan yavru balık yemi ile beslenmiştir (BioAqua, Çamlı Yem, İzmir, Türkiye).

24 saat, 96 saat ve 15 gün sonunda her akvaryumdan 6'şar balık alınarak dekapitasyon ile öldürülmüştür. Beyin dokuları buz üzerinde disekte edilip soğuk fizyolojik su (%0.59 NaCl) ile yıkayıp kurulandıktan sonra tartılıp analizlere kadar -80°C'de saklanmıştır.

Biyokimyasal analizlerde beyin dokuları, 2.5 mM ATP içeren PBS (fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi) içerisinde 1/20 ağırlık/hacim (w/v) oranında homojenizatörde buz içerisinde 3 dakika homojenize edilmiş ve homojenat +4°C'de 16000 x g'de 20 dakika santrifüjlendikten (De Boeck ve ark., 2003) sonra süpernatantlarda TBARS, protein ve HSP70 miktarları ile GPx, GR, GST ve AChE enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Total GSH ile GSSG miktarlarının belirlenebilmesi için elde edilen süpernatantlar 1/0.5 (v/v) oranında %10 sülfosalisilik asit çözeltisi ile karıştırılarak +4°C'de 10000 x g'de 5 dakika santrifüjlenmiştir.

3.2.2. Analiz Yöntemleri

3.2.2.1. Total Glutasyon Yöntemi

Total GSH miktarının belirlenmesi, GSH'ın DTNB tarafından okside edilirken oluşan sarı renkli 2-nitro-5-tiyobenzoik asidin absorbansının 412 nm'de ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Ortamda bulunan GSSG, GR enzimi varlığında NADPH'ın indirgenmesi ile GSH'a dönüştürülmektedir (Anderson, 1985).

Ayırıcılar

1. Stok Tampon Çözeltisi: 143 mM sodyum-potasyum fosfat tamponu, 6.3 mM EDTA içeren (pH 7.5)
2. 0.3 mM NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutasyon redüktaz

Yöntem

Total GSH miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Total Glutasyon Yöntemi

Çözeltiler	Kör (μL)	Örnek (μL)
NADPH	700	700
DTNB	100	100
Örnek	-	25
Saf su	190	165
Çalkalanır ve 30°C 'de 3 dakika inkübe edilir.		
Glutasyon redüktaz	10	10

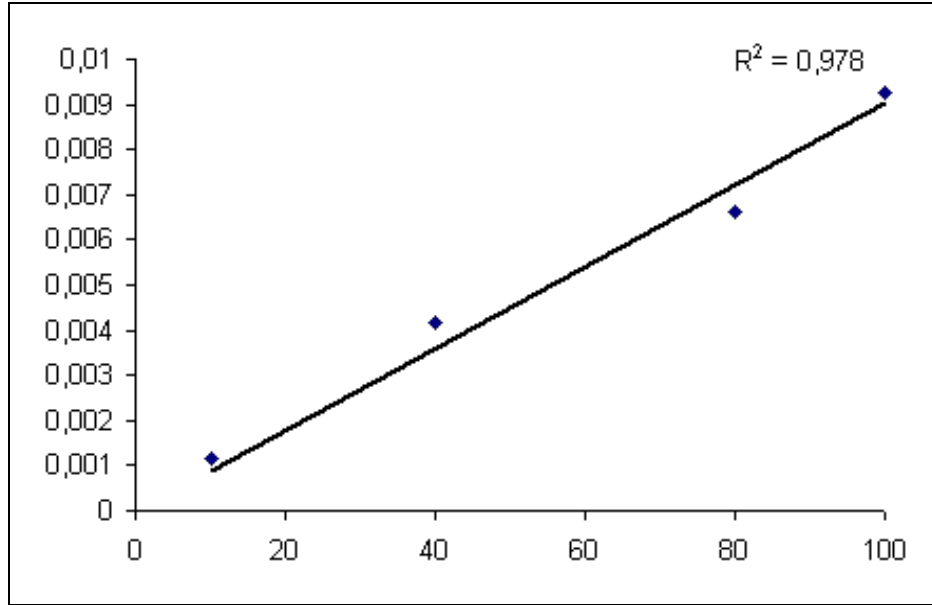
Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C 'de, 0. dakika ve 3. Dakika absorbansları kaydedilir.

Hesaplama

Elde edilen absorbans değerleri GSH ile hazırlanan standart grafik kullanılarak derişim değerlerine dönüştürülür.

Standart Grafiğin Hazırlanması

Çalışma tamponu ile 1000 ng/mL'lik GSH stok çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltilerden 10, 40, 80, 100 ng/mL'lik derişimlerde seyreltmeler yapılır. Bunlar çalışma standartlarının hazırlanmasında kullanılır. Standart grafik için tGSH miktarının ölçülmesinde uygulanan yöntem kullanılır.



Şekil 3.1. GSH Standart Grafiği

3.2.2.2. Okside Glutasyon Yöntemi

Okside glutasyon miktarı, tGSH miktarının ölçülmesinde kullanılan yöntem ile belirlenmektedir. Farklı olarak; 5-sülfosalisilik asit ile hazırlanan süpernatant ölçümden önce aşağıdaki gibi 2-vinilpiridin ile türevlendirilmektedir (Griffith, 1980).

Örnek Hazırlanması

100 µL süpernatant üzerine 2 µL 2-vinilpiridin eklenir ve pH7.0'a ayarlanır. Örnekler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilir.

Ayırıcılar

1. Stok Tampon Çözeltisi: 143 mM sodyum-potasyum fosfat tamponu, 6.3 mM EDTA içeren (pH7.5)
2. 0.3 mM NADPH
3. 6 mM DTNB
4. 50 U/mL Glutasyon redüktaz

Yöntem

GSSG miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Okside Glutasyon Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
NADPH	700	700
DTNB	100	100
Örnek	-	25
Saf su	190	165
Çalkalanır ve 30°C'de 3 dakika inkübe edilir.		
Glutasyon redüktaz	10	10

Çalkalanarak 412 nm dalga boyunda, 30°C'de, 0. dakika ve 3. dakika absorbansları kaydedilir.

Hesaplama

Elde edilen absorbans değerleri tGSH için hazırlanan standart grafik kullanılarak derişim değerlerine dönüştürülür.

Redükte Glutasyon miktarı ile GSH/GSSG oranının belirlenmesi

Redükte glutasyon, tGSH miktarından GSSG miktarının çıkartılmasıyla belirlenmektedir. Bu işlem için şu formül kullanılmaktadır (Pena-Llopis ve ark., 2001):

$$tGSH = GSH + 2 \times GSSG \quad (3.1.)$$

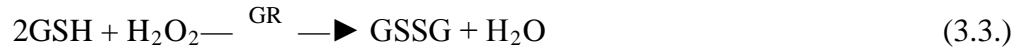
GSH/GSSG oranı ise şu formülle hesaplanmaktadır:

$$\frac{GSH}{GSSG} = \frac{tGSH - GSSG}{GSSG / 2} \quad (3.2.)$$

tGSH, GSH ve GSSG derişimleri her mg protein içerisindeki µg GSH ekivalenti olarak verilmiştir.

3.2.2.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Glutasyon peroksidaz ile *t*-bütil hidroperoksit varlığında GSH'nin GSSG'ye oksidasyonu gerçekleşir, GSSG ise GR ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'ye oksidasyonu sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür (Beutler, 1984) (Tepkime 1,2).



Ayırçlar

1. Tris Tamponu (pH8.0)
2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. 7 mM *t*-bütil hidroperoksit

Yöntem

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir. Kör içerisine örnekte konulan miktar kadar su eklenir (Çizelge3.3.).

Çizelge 3.3. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Örnek (µL)
Saf su	660
Tris tamponu	100
GSH	25
GR	100
NADPH	100
Örnek	10
37°C’de 10 dakika inkübe edilir.	
<i>t</i> -bütil hidroperoksit	10

Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan tepkime 37°C’de 1 cm ışık yolu bulunan kuvartz küvetlerde, 340 nm dalga boyunda 0., 2.5., 5. dakikalarda absorbans değerleri ölçülerek izlenir.

Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{t} \times \frac{V_t}{6.22 \times V_0} \quad (3.5.)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

6.22 = 1 nmol NADPH’ın 1 cm’lik ışık yolunda verdiği OD değeri

$$\text{GPx spesifik aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPx Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.6.)$$

3.2.2.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Glutasyon redüktaz, NADPH varlığında GSSG’nin GSH’ye indirgenmesini katalizler. GR aktivitesi, NADPH’ın NADP⁺’ye yükseltgenmesi sırasındaki

absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması esasına dayanır (Carlberg ve Mannervik, 1975).

Ayırıcılar

1. 100 mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH8.0)
2. Günlük Tampon (0.12 mM NADPH ve 1 mM GSSG'nin tampon içerisinde çözülmesi ile hazırlanır.)

Yöntem

Glutasyon redüktaz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir.

Çizelge 3.4. Glutasyon Redüktaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Saf su	100	-
Günlük tampon	900	900
Örnek	-	100

Çalkalanarak 37°C'de, 340 nm dalga boyunda köre karşı 0. ve 5. dakikalardaki absorbanslar okunur.

Hesaplama

$$\text{GR Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{6.22} \times \frac{V_t}{V \text{ örnek}} \quad (3.7.)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam Hacim

V_0 = Örnek Hacmi

6.22 = 1 nmol NADPH'ın 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri.

$$\text{GST spesifik aktivitesi ((µmol/min)/mg protein)} = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}} \quad (3.8.)$$

3.2.2.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Glutasyon S-transferaz, GSH'taki tiyol grubunun eletrofilik bileşiklerle tepkimesini katalizler. GST aktivitesi, GSH ile 1-kloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB)

konjugasyonu sırasında absorbans değişiminin 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür (Habig ve ark., 1974).

Ayırıklar

1. 100 mM Tris Tamponu (pH7.4)
2. 1 mM CDNB
3. Redükte Glutasyon

Yöntem

Glutasyon S-transferaz aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir.

Çizelge 3.5. Glutasyon S-Transferaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	1100	1050
CDNB	50	50
GSH	50	50
Örnek	-	50

Çalkalanarak 25°C'de, 340 nm dalga boyunda, 2 dakika boyunca absorbandsaki artış şeklinde ölçülür.

Hesaplama

$$\text{GST Aktivitesi (} \mu\text{mol/dakika)/mL) = \frac{\Delta OD}{t} \times \frac{V_t}{0.0096 \times V_0} \quad (3.9.)$$

$$\text{GST Spesifik Aktivitesi ((} \mu\text{mol/dakika)/mg protein) = \frac{\text{GST Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}} \quad (3.10.)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

V_t = Toplam Hacim

V_0 = Örnek Hacmi

0.0096 = 1 mM CDNB'nin 1 cm'lik ışık yolunda verdiği OD değeri

3.2.2.6. TBARS Yöntemi

Lipid peroksidasyonunun sekonder ürünleri olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Aerobik koşullarda, TBARS'ın, pH 3.5'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de tepkimesi sonucu pembe renkli bir kompleks oluşur ve bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda absorbanans verir (Ohkawa ve ark., 1979).

Ayıraçlar

1. %8.1 Sodyum dodesil-sülfat (SDS)
2. %20 Asetik asit (HAc) (pH3.5)
3. %0.8 Tiyobarbitürik asit (TBA) (pH 3.5)
4. *n*-Butanol-piridin (nBu-Pri) çözeltisi (14:1)
5. Stok standart: 1,1',3,3' tetrametoksiopropan (yoğunluk 0.99 g/mL)

Yöntem

TBARS miktarını ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı tüplere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.7.)

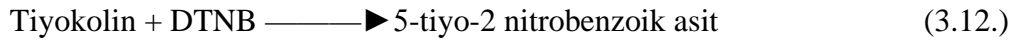
Çizelge 3.6. TBARS Yöntemi

Çözeltiler	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Standart (10nmol/mL)	-	0.1	-
Örnek	-	-	0.1
%8.1 SDS	0.2	0.2	0.2
%20 Hac	1.5	1.5	1.5
% 0.8 TBA	1.5	1.5	1.5
Saf su	0.8	0.7	0.7
95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulur.			
Saf su	1.0	1.0	1.0
<i>n</i> -Butanol/piridin	5.0	5.0	5.0

Kuvvetle çalkalanır ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbanansı okunur. Sonuçlar standart grafikten değerlendirilir.

3.2.2.7. Asetilkolinesteraz Yöntemi

Asetilkolinesteraz enzimi, asetilkolinin asetat ile tiyokoline parçalanmasını katalizler. Oluşan tiyokolinin DTNB ile tepkimesi sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 412 nm dalga boyunda ölçülmesi ile AChE aktivitesi belirlenmektedir (Ellman ve ark., 1961) (Tepkime 3, 4).



Ayırıcılar

1. 0.1 M sodyum-potasyum fosfat tamponu (pH 8.0)
2. 0.01 M DTNB
3. 8.52×10^{-3} M Etopropazin [Bütirikolinesteraz (BChE) İnhibitörü]
4. 0.015 M Asetilkolintiyoiyodür

Yöntem

Asetilkolinesteraz enzim aktivitesini ölçmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere farklı küvetlere aşağıdaki şekilde eklenir (Çizelge 3.8.).

Çizelge 3.7. Asetilkolinesteraz Yöntemi

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

Örnek ve kör küvetlerinin 412 nm dalga boyunda, 0. ve 5. Dakikadaki absorbansları ölçülür.

Hesaplama

$$\text{AChE Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{t} \times \frac{V_t}{V_0} \times 13.6 \quad (3.13.)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

V_0 = Örnek hacmi

13.6 = Ekstinksiyon katsayısı

$$\text{AChE Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{AChE Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}} \quad (3.14.)$$

3.2.2.8. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bradford yöntemi, proteinlerde bulunan arjinin, triptofan, tirozin, histidin ve fenilalanin gibi aminoasit rezidülerinin, Coomassie brilliant blue G-250 boyasına bağlanmasıyla mavi renkli kompleks oluşması esasına dayanır. Renklendirilmiş çözeltinin absorbansı 595 nm’de ölçülür (Bradford, 1976).

Ayırıcılar

1. Bradford Ayırıcı

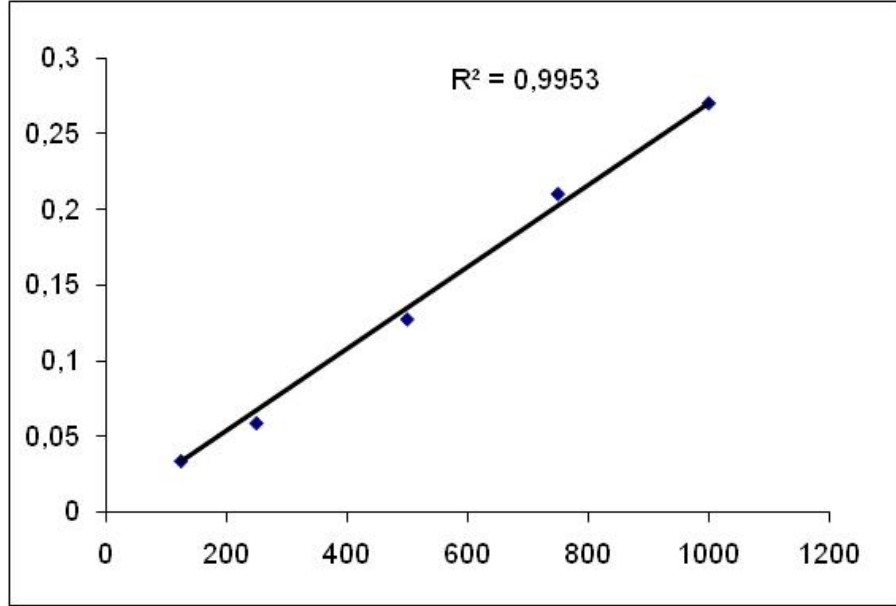
Yöntem

Seyreltilmiş beyin homojenatlarından 5 µL alınarak üzerine 250 µL Bradford ayırıcı eklenir ve karıştırılarak 15 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Bu süre sonunda örnekler mikropalakalara uygulanarak 595 nm’de mikropalaka okuyucuda absorbansları okunarak kaydedilir. Kör olarak örnekle aynı miktarda saf su kullanılır.

Protein Standart Grafiğinin Hazırlanması

Sığır serum albumini kullanılarak 1000 µg/mL’lik stok protein çözeltisi hazırlanır. Stok protein çözeltisi 125, 250, 500, 750, 1000 µg/mL derişimlerde seyreltilerek standart protein çözeltileri hazırlanır. Örnek protein derişimlerinin

ölçülmesinde kullanılan yöntem ile bu standartların absorbans değerleri belirlenir ve standart grafik çiziminde kullanılır.



Şekil 3.2. Protein Standart Grafiği

3.2.2.9. HSP70 Miktarının Belirlenmesi

Anti-HSP70 monoklonal antipadisi ile HSP70'in oluşturduğu immunokomplekse sekonder antipadi olarak kullanılan ve peroksidaz bağı bulunan anti-mouse IgM bağılanır. Anti-mouse IgM'ye bağı peroksidazın *o*-fenilendiamin dihidroklorid (OPD) ile tepkimesi sonucu sarı renkli ürün açığa çıkar. Sarı renkli ürün ile durdurucu çözeltinin tepkimesi sonucu oluşan turuncu renkli ürünün absorbansının 492 nm'de ölçülmesi esasına dayanır.

Ayırçılar

1. Kaplama Tamponu: 15 mM Na₂CO₃, 39 mM NaHCO₃, %0.02 NaN₃, pH9.6

2. Yıkama Tamponu: 50 mM Tris Baz, 127 mM NaCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 5.1 mM Na₂HPO₄, %0.1 NaN₃, %0.05 Tween 20, pH 7.2

3. Bloklama Tamponu: %3 BSA ve %0.05 Tween 20 içeren PBS Tamponu

4. Primer Antibadi: Anti-HSP70 monoklonal antibadi bloklama tamponu ile 1/1000 oranında seyreltilir.

5. Sekonder Antibadi: Peroksidaz bağlı anti-mouse IgM bloklama tamponu ile 1/2000 oranında seyreltilir.

6. Sigma Fast OPD Substrat: 20 mL ultra saf suda çözülür.

7. Durdurucu Çözelti: 3M H₂SO₄

Yöntem

Bradford yöntemi ile beyin homojenatlarının protein derişimleri belirlendikten sonra, protein derişimleri 35 µg/mL olacak şekilde kaplama tamponu ile ayarlanır. Seyreltilen örnekler 5 dakika kaynatılır. 96 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı olacak şekilde uygulanır. Kör olarak örnekle eşit miktarda kaplama tamponu uygulanır (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.8. HSP70 Yöntemi

Çözeltiler	Miktar (µL)	İnkübasyon Koşulları ve Süreleri
Örnek	100	16 saat +4°C
Yıkama Tamponu	300	4 kez yıkanır
Bloklama Tamponu	200	2 saat +37°C
Yıkama Tamponu	300	4 kez yıkanır
Primer Antibadi	100	2 saat +37°C
Yıkama Tamponu	300	4 kez yıkanır
Sekonder Antibadi	100	1 saat +37°C
Yıkama Tamponu	300	4 kez yıkanır
SigmaFast OPD Substrat	200	1 saat +37°C
Durdurucu Çözelti	50	

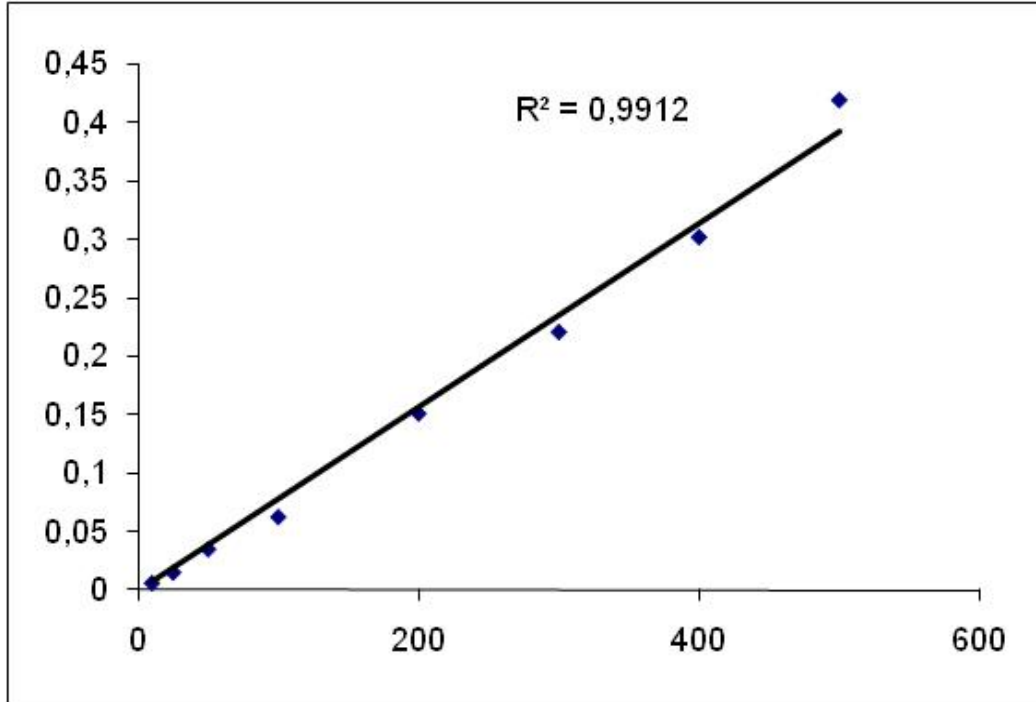
Durdurucu çözelti eklendikten sonra 492 nm'de köre karşı okunan absorbanlar kaydedilir (De Boeck ve ark., 2003).

Hesaplama

Elde edilen absorbans değerleri sıgır beyninden elde edilen HSP70 ile hazırlanan standart grafikten değerlendirilir.

Standart Grafiğın Hazırlanması

Kaplama tamponu ile 10 ng/μL'lik HSP70 stok çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiden 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ng/100 μL'lik derişimlerde kaplama tamponu ile seyreltmeler yapılır. Hazırlanan standart çözeltiler HSP70 belirlenmesi için kullanılan yöntem ile çalışılarak absorbans değerleri kaydedilir.



Şekil 3.3. HSP70 Standart Grafiğı

3.2.3.İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 11.5 paket programında One-Way ANOVA-Duncan testi kullanılarak $P < 0.05$ önem derecesinde belirlenmiştir (Kinneer ve Gray, 1995).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada *O. niloticus*'da beyin dokusunda OP pestisid fenthionun ve CYP450 inhibitörü PBO'nun 24 saat, 96 saat ve 15 gün sürelerde, GSH redoks durumu ile GSH-bağımlı enzim aktivitelere, lipid peroksidasyonuna, HSP70 miktarına ve AChE enzim aktivitesine etkileri araştırılmıştır.

4.1.1. Çözücü Asetonun Etkileri

Araştırmada PBO için çözücü olarak kullanılan asetonun araştırılan parametreler üzerine etkisi Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Asetonun araştırılan parametreler üzerinde kontrole ve zamana göre bir etkisi bulunamamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 4.1. *O. niloticus*'da beyin dokusunda çözücü asetonun parametrelere etkileri

	Su Kontrol			Çözücü Kontrol		
	24 Saat	96 Saat	15 Gün	24 Saat	96 Saat	15 Gün
tGSH	1.65±0.14	1.47±0.06	1.66±0.09	1.80±0.12	1.60±0.05	1.52±0.09
GSH	1.32±0.15	1.13±0.09	1.21±0.08	1.38±0.16	1.31±0.09	1.16±0.12
GSSG	0.09±0.011	0.08±0.006	0.09±0.009	0.09±0.011	0.11±0.005	0.10±0.009
GSH/ GSSG	34.75±4.159	37.92±4.242	36.62±7.062	37.76±4.674	27.09±1.571	27.87±2.184
GPx	0.03±0.002	0.04±0.002	0.04±0.002	0.03±0.003	0.04±0.002	0.04±0.003
GR	0.004±0.0004	0.005±0.0009	0.003±0.0004	0.005±0.0005	0.004±0.0003	0.004±0.0003
GST	27.26±1.531	21.24±1.161	22.66±0.988	26.24±2.198	23.47±1.457	25.44±1.577
AChE	0.13±0.028	0.13±0.012	0.14±0.013	0.14±0.015	0.11±0.008	0.11±0.006
HSP70	6.99±0.626	6.10±0.431	5.97±0.228	6.15±0.326	6.72±0.204	5.27±0.344
TBARS	4.56±0.350	4.48±0.340	4.67±0.239	4.35±0.417	4.59±0.460	4.58±0.337

Aseton etkisinde kontrole ve zamana göre herhangi bir istatistiksel ayırım bulunamamıştır ($P>0.05$).

$X \pm Sx$: Aritmetik ortalama±Standart hata

4.1.2. Fenthion ve PBO Etkisinde Glutatyon ile İlgili Parametrelerdeki Değişimler

Parametrelerdeki değişimler değerlendirilirken, fenthion etkisinde aseton bulunmadığı için kontrol terimi su kontrolü, PBO ve fenthion+PBO etkisinde ise ortamda PBO'nun çözücü maddesi olarak kullanılan aseton bulunduğundan kontrol terimi çözücü kontrolü ifade etmektedir.

4.1.2.1. tGSH Miktarındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda tGSH miktarındaki değişimler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Beyin dokusunda 15 gün sonunda tGSH miktarı fenthion etkisinde 24 saat sonunda %63 artış göstermiştir. PBO grubunda 24. saatte %19 azalış belirlenmiştir. 96. saat ve 15. günde tGSH miktarı fenthion+PBO grubunda sırasıyla %20 ve %28 oranında azalmıştır.

Fenthion grubunda zamana bağlı olarak 15. günde 24 ve 96 saat süreye göre sırasıyla %64 ve %93 artış belirlenmiştir. Fenthion+PBO grubunda 24 saat etki süresine göre zamana bağlı olarak 96. saat ve 15. günde sırasıyla %15 ve %27 azalış belirlenmiştir.

Fenthion grubuna göre fenthion+PBO grubunda tGSH miktarı 15. günde %60 azalmıştır.

4.1.2.2. GSH Miktarındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH miktarındaki değişimler Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Fenthionun 15 gün etkisinde GSH miktarı %79 artmıştır. GSH miktarı PBO etkisinde 24 sonunda %36 azalmıştır. Fenthion+PBO grubunda ise azalma sırasıyla %41 ve %43 oranları ile 96. saat ve 15. günde meydana gelmiştir.

GSH miktarı fenthion grubunda 15 günde, 24 ve 96 saat süreye göre sırasıyla %76 ve %111 artış göstermiştir. Fenthion+PBO grubunda 24 saat süreye göre 96. saat ve 15. günde sırasıyla %29 ve %39 azalış belirlenmiştir.

Fenthion grubuna göre fenthion+PBO grubunda 15. günde %70 azalış meydana gelmiştir.

Çizelge 4.2. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun tGSH ve GSH miktarına etkileri

tGSH			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	1.65±0.14 ^{ax}	1.47±0.06 ^{ax}	1.66±0.09 ^{ax}
Fenthion	1.65±0.08 ^{ax}	1.40±0.09 ^{ax}	2.70±0.16 ^{by}
Çözücü Kontrol	1.80±0.12 ^{ax}	1.60±0.05 ^{ax}	1.52±0.09 ^{ax}
PBO	1.45±0.10 ^{bx}	1.61±0.11 ^{ax}	1.53±0.13 ^{ax}
Fenthion+PBO	1.50±0.09 ^{abx}	1.28±0.10 ^{bxy}	1.09±0.08 ^{by*}
GSH			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	1.32±0.15 ^{ax}	1.13±0.09 ^{ax}	1.21±0.08 ^{ax}
Fenthion	1.23±0.09 ^{ax}	1.03±0.13 ^{ax}	2.17±0.18 ^{by}
Çözücü Kontrol	1.38±0.16 ^{ax}	1.31±0.09 ^{ax}	1.16±0.12 ^{ax}
PBO	0.88±0.10 ^{bx}	1.13±0.14 ^x	1.11±0.14 ^{ax}
Fenthion+PBO	1.08±0.10 ^{abx}	0.77±0.12 ^{by}	0.66±0.08 ^{by*}

a, b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı, x ve y harfleri ise bir grubun farklı süreler arasındaki ayrımını belirtmek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

* işareti fenthion+PBO grubunun fenthion grubundan ayrımını göstermektedir ($P<0.05$).

$X \pm Sx$: Aritmetik ortalama±Standart hata

4.1.2.3. GSSG Miktarındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSSG miktarındaki değişimler Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

96. saatte GSSG miktarı fenthion, PBO ve fenthion+PBO gruplarında sırasıyla %63, %64 ve %55 artış göstermiştir. Artış fenthion+PBO grubunda 15. günde de %150 oranı ile artış devam etmiştir.

Zamana bağlı olarak PBO uygulamasında 24. saate göre 96 saat sonunda %125 artış belirlenmiştir. Fenthion+PBO grubunda 24 saat etki süresine göre 96. saat ve 15. günde sırasıyla %89 ve %178 artış göstermiştir.

Fenthion+PBO etkisinde fenthiona göre 15. günde %150 artış belirlenmiştir.

4.1.2.4. GSH/GSSG Oranındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH/GSSG oranındaki değişimler Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

GSH/GSSG oranı fenthion etkisinde 96. saat ve 15. günde sırasıyla %43 azalıp %46 artarken aynı sürelerde fenthion+PBO etkisinde sırasıyla %44 ve %75 azalmıştır.

GSH/GSSG oranı fenthion ve PBO'nun 96 saat etkilerinde 24 saat etkiye göre sırasıyla %37 ve %43 azalmıştır. Fenthion etkisinde 15. günde GSH/GSSG oranı 24. saate göre %46 artmıştır. Fenthion+PBO grubunda 24. saate göre 96. saat ve 15. günde meydana gelen azalmalar sırasıyla %54 ve %79 oranlarındadır.

Fenthion etkisine göre fenthion+PBO grubunda 15. günde %86 azalış belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun GSSG miktarına ve GSH/GSSG oranına etkileri

GSSG			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	0.09±0.011 ^{ax}	0.08±0.006 ^{ax}	0.09±0.009 ^{ax}
Fenthion	0.09±0.005 ^{ax}	0.13±0.018 ^{bx}	0.10±0.006 ^{ax}
Çözücü Kontrol	0.09±0.011 ^{ax}	0.11±0.005 ^{ax}	0.10±0.009 ^{ax}
PBO	0.08±0.008 ^{ax}	0.18±0.025 ^{by}	0.09±0.006 ^{ax}
Fenthion+PBO	0.09±0.016 ^{ax}	0.17±0.031 ^{by}	0.25±0.018 ^{bz*}
GSH/GSSG			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	34.75±4.16 ^{ax}	37.92±4.24 ^{ax}	36.62±7.06 ^{ax}
Fenthion	34.08±2.51 ^{ax}	21.62±3.12 ^{by}	49.84±3.13 ^{bz}
Çözücü Kontrol	37.76±4.67 ^{ax}	27.09±1.57 ^{ay}	27.87±2.18 ^{ay}
PBO	33.42±3.08 ^{ax}	19.22±4.66 ^{aby}	28.82±1.73 ^{axy}
Fenthion+PBO	33.16±4.52 ^{ax}	15.16±2.63 ^{by}	7.02±0.64 ^{by*}

a, b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı; x, y ve z harfleri ise bir grubun farklı süreler arasındaki ayrımını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($N=6$).

* işareti fenthion+PBO grubunun fenthion grubundan ayrımını göstermektedir ($P<0.05$).

$X \pm Sx$: Aritmetik ortalama±Standart hata

4.1.2.5. GPx Aktivitesindeki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GPx aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Fenthion ve PBO etkisinde beyin dokusunda GPx aktivitesinde değişim belirlenmemiştir.

4.1.2.6. GR Aktivitesindeki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GR aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

GR aktivitesinde 15. günde fenthion grubunda kontrole göre % 100 artış belirlenmiştir.

Zamana bağlı olarak fenthion grubunda 96 saat etki süresine göre 15. günde %50 artış belirlenmiştir.

Fenthion etkisinde artan GR aktivitesi fenthion+PBO etkisinde kontrol düzeylerine azalmıştır (%33).

4.1.2.7. GST Aktivitesindeki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GST aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Fenthion etkisinde 24. saatte %20 oranında azalan GST spesifik aktivitesi, 15 gün etkisinde ise %40 oranında artış göstermiştir. Fenthion+PBO grubunda aktivite PBO etkisine göre %72, çözücü kontrole göre ise %21 oranında artmıştır.

Kontrol grubunda zamana göre istatistiksel ayırım olmasından dolayı fenthionun zamana göre etkisi değerlendirmeye alınmamıştır. GST aktivitesi PBO grubunda 24. saate göre 15. günde %34 artış göstermiştir. Fenthion+PBO etkisinde 24. saate göre 96. saatte %40 azalmıştır.

GST aktivitesinde fenthion etkisine göre fenthion+PBO grubunda 24 saat etki süresinde %46 artış belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun GPx, GR ve GST enzim aktivitelerine etkileri

GPx			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	0.03±0.002	0.04±0.002	0.04±0.002
Fenthion	0.04±0.004	0.04±0.005	0.03±0.003
Çözücü Kontrol	0.03±0.003	0.04±0.002	0.04±0.003
PBO	0.03±0.004	0.04±0.003	0.03±0.001
Fenthion+PBO	0.11±0.077	0.03±0.002	0.03±0.003

GR			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	0.004±0.0004 ^{ax}	0.005±0.0009 ^{ax}	0.003±0.0004 ^{ax}
Fenthion	0.005±0.0004 ^{axy}	0.004±0.0004 ^{ax}	0.006±0.0007 ^{by}
Çözücü Kontrol	0.005±0.0005 ^{ax}	0.004±0.0003 ^{ax}	0.004±0.0003 ^{ax}
PBO	0.004±0.0005 ^{ax}	0.004±0.0004 ^{ax}	0.004±0.0002 ^{ax}
Fenthion+PBO	0.004±0.0003 ^{ax}	0.003±0.0004 ^{ax}	0.004±0.0004 ^{ax*}

GST			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	27.26±1.53 ^{ax}	21.24±1.16 ^{ay}	22.66±0.99 ^{ay}
Fenthion	21.78±0.98 ^{bx}	20.29±1.26 ^{ax}	31.59±1.49 ^{by}
Çözücü Kontrol	26.24±2.20 ^{abx}	23.47±1.46 ^{ax}	25.44±1.58 ^{ax}
PBO	18.47±0.87 ^{ax}	19.28±0.92 ^{ax}	24.65±2.67 ^{ay}
Fenthion+PBO	31.69±4.87 ^{bx*}	19.00±2.14 ^{ay}	32.64±3.48 ^{ax}

a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı; x ve y harfleri ise bir grubun farklı süreler arasındaki ayrımı göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

* işareti fenthion+PBO grubunun fenthion grubundan ayrımını göstermektedir ($P<0.05$).

$X \pm Sx$: Aritmetik ortalama±Standart hata.

4.1.3. Fenthion ve PBO etkisinde HSP70 Miktarındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda HSP70 miktarındaki değişimler Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Fenthion etkisinde HSP70 miktarı 15. günde %113 artış göstermiştir. Fenthion+PBO'nun 24 saat ve 15 gün etkisinde ise HSP70 miktarı sırasıyla %22 ve %82 oranında artmıştır.

Zamana bağlı olarak fenthion grubunda 24 saat etkiye göre 15. günde %132 artış meydana gelmiştir. Çözücü kontroldeki zamana bağlı değişim nedeniyle fenthion+PBO grubundaki zamana bağlı değişimler değerlendirmeye alınmamıştır.

Fenthion grubuna göre fenthion+PBO grubunda 24 saat sürede %36 artış ve 15 gün etki süresinde %25 azalış belirlenmiştir.

4.1.4. Fenthion ve PBO etkisinde TBARS Miktarlarındaki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda TBARS miktarındaki değişimler Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Beyin dokusunda fenthion ve fenthion+PBO grubunda sırasıyla %86 ve %91 artış belirlenmiştir. Fenthion+PBO grubunda 96 saat PBO etkisine göre %41, 15. günde ise çözücü kontrole göre TBARS miktarında %37 artış belirlenmiştir.

Fenthionun 24 saat etkisinde TBARS miktarında meydana gelen artış 96. saatte kontrol düzeylerine azalmıştır. PBO grubunda 24 saat etki süresine göre 15. günde %47 artış belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun HSP70 ve TBARS miktarlarına etkileri

HSP70			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	6.99±0.63 ^{ax}	6.16±0.43 ^{ax}	5.97±0.23 ^{ax}
Fenthion	5.48±0.56 ^{ax}	5.78±0.41 ^{ax}	12.72±0.52 ^{by}
Çözücü Kontrol	6.15±0.33 ^{axy}	6.91±0.20 ^{ax}	5.27±0.34 ^{ay}
PBO	5.95±0.39 ^{ax}	6.06±0.21 ^{ax}	5.40±0.29 ^{ax}
Fenthion+PBO	7.47±0.56 ^{bx*}	6.14±0.23 ^{ay}	9.57±0.42 ^{bz*}

TBARS			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	4.56±0.35 ^{ax}	4.48±0.34 ^{ax}	4.67±0.24 ^{ax}
Fenthion	8.50±1.57 ^{bx}	4.36±0.38 ^{ay}	4.86±0.28 ^{ay}
Çözücü Kontrol	4.35±0.42 ^{ax}	4.59±0.46 ^{abx}	4.58±0.34 ^{ax}
PBO	2.75±0.29 ^{ax}	3.45±0.17 ^{axy}	4.04±0.37 ^{ay}
Fenthion+PBO	8.31±2.13 ^{bx}	4.87±0.57 ^{bx}	6.26±0.65 ^{bx}

a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı; x, y ve z harfleri ise bir grubun farklı süreler arasındaki ayrımını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel ayırım bulunmaktadır ($N=6$).

* işareti fenthion+PBO grubunun fenthion grubundan ayrımını göstermektedir ($P<0.05$).

$X \pm Sx$:Aritmetik ortalama±Standart hata

4.1.5. Fenthion ve PBO etkisinde AChE Aktivitesindeki Değişimler

Fenthion ve PBO etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda AChE aktivitesindeki değişimler Çizelge 4.6.'de verilmiştir.

24. ve 96. saat ile 15. günde fenthion etkisi sonunda AChE aktivitesinde sırasıyla %54, %62 ve %71 inhibisyon meydana gelmiştir. Fenthion+PBO grubunda ise 15. günde ise %36 azalış saptanmıştır.

Zamana bağlı olarak PBO grubunda 24. saate göre 15. günde %23 azalış ve fenthion+PBO grubunda ise 24. saate göre 96. saat ve 15. günde sırasıyla %40 ve %53 azalış belirlenmiştir.

Fenthiona göre fenthion+PBO etkisinde 24. ve 96. saatte AChE aktivitesinin sırasıyla %150 ve %80 daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthion ve PBO'nun AChE enzim aktivitesine etkileri

AChE			
	24 saat	96 saat	15 gün
Kontrol	0.013±0.0028 ^{ax}	0.013±0.0012 ^{ax}	0.014±0.0013 ^{ax}
Fenthion	0.006±0.0005 ^{bx}	0.005±0.0005 ^{bx}	0.004±0.0003 ^{bx}
Çözücü Kontrol	0.014±0.015 ^{ax}	0.011±0.0008 ^{ax}	0.011±0.0006 ^{ax}
PBO	0.013±0.0008 ^{ax}	0.012±0.0008 ^{axy}	0.010±0.0013 ^{ay}
Fenthion+PBO	0.015±0.0012 ^{ax*}	0.009±0.0008 ^{ay*}	0.007±0.0010 ^{by}

a ve b harfleri aynı süre içerisinde gruplar arasındaki ayrımı; x, y harfleri ise bir grubun farklı süreler arasındaki ayrımını göstermek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0.05$ düzeyinde istatistiksel ayrım bulunmaktadır ($N=6$).

* işareti fenthion+PBO grubunun fenthion grubundan ayrımını göstermektedir ($P<0.05$).

$X \pm Sx$: Aritmetik ortalama±Standart hata

4.2. Tartışma

Pestisidler, akuatik sistemde kirliliğe neden olarak balıklar üzerinde toksik etki göstermektedir (Barbieri ve Ferreira, 2011). Pestisidlerin etkilediği sistemlerden biri hücrede en önemli koruyucu sistemlerden olan antioksidant savunma sistemidir. Bir antioksidant sistem bileşeni olan GSH bazı enzimlerin substratı olarak görev yapmakta ve hücre içine alınan ksenobiyotiklerin detoksifikasyon tepkimelerinde kullanılmaktadır (Becker ve ark., 2001). Birçok pestisid türü ile yapılan araştırmalarda pestisid toksisitesi sonucu oksidatif stres olduğu ve lipid peroksidasyonunun oksidatif stres biyomarkırı olarak kullanılabileceği belirlenmiştir (Pandey ve ark., 2001; Sayeed ve ark., 2003; Atif ve ark., 2005; Fortunato ve ark., 2006; Rai ve Sharma, 2007). Tez çalışmasında fenthionun uygulanan derişiminde GSH metabolizması, lipid peroksidasyonu ve HSP70 miktarını etkileyerek oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir. Modülatör olarak kullanılan PBO'nun fenthionun oksidatif stres etkisini artırdığı ve AChE inhibisyon etkisini azalttığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Fenthionun, kısa süreli etkisinde *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH/GSSG oranını azaltıp, lipid peroksidasyonunu artırarak uzun süreli uygulamada ise tGSH ve GSH miktarında, GSH/GSSG oranında artışa neden olarak oksidatif yanıtlar oluşturduğu belirlenmiştir. Hücrede GSH redoks durumunda oluşan değişiklikler ve lipid peroksidasyonu oksidatif stres markırı olarak değerlendirilmektedir (Pena-Llopis ve ark., 2003; Sevgiler ve ark., 2007; Üner ve ark., 2008; Üner ve ark., 2009). *C. carpio*'da bütaklorun karaciğer, solungaç ve böbrek dokularında zamana bağlı olarak GSH miktarını azaltıp lipid peroksidasyonunu artırarak oksidatif stresi indüklediği belirlenmiştir (Tramboo ve ark., 2011). *C. auratus*'da 3,4-dichloroaniline etkisinde karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonunu arttığı, GSH miktarının ise azaldığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2003). *B. cephalus*'da OP metil parathionun solungaç ve kas dokularında GSH miktarını azaltıp lipid peroksidasyonunun arttığı oksidatif strese neden olduğu bulunmuştur (Monteiro ve ark., 2006).

Fenthionun balık beyin dokusunda oksidatif strese neden olduğu daha önce yapılan laboratuvar çalışmalarında gösterilmiştir. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthionun GSSG miktarını, GSH/GSSG oranını ve GPx aktivitesini artırarak oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir (Piner ve ark., 2007). *C. carpio*'da fenthionun beyin dokusunda GSH miktarı, GSH/GSSG oranı ve GST aktivitesini artırarak oksidatif yanıtlar oluşturduğu bildirilmiştir (Üner ve ark., 2009). Bu çalışmada fenhinonun kısa süreli etkide lipid peroksidasyonunu artırarak ve uzun süreli etkide ise HSP70 miktarını artırarak oksidatif strese neden olduğu ve oluşan bu etkinin GSH-bağımlı antioksidant sistem tarafından giderilemediği düşünülmektedir.

Sitokrom P450 enzimlerinin kompetitif ya da non-kompetitif inhibitörü olarak pestisid toksisitesini artırmak üzere kullanılan PBO (Straus ve Chambers, 2006) memelilerde olduğu gibi balıklarda da sitokrom P450 sisteminin indükleyicisi olarak da etki gösterebilmektedir (Erickson ve ark., 1988; Ryu ve ark., 1996).

Tez çalışmasında PBO ve fenthionun birlikte etkisinde tGSH, GSH, miktarları ile GSH/GSSG oranı zamana bağlı olarak azalırken GSSG miktarı artış göstermiştir. GSH redoks durumundaki değişiklikler fenthionun tek başına uygulamasına göre de önemlidir. PBO'nun uygulanan derişimde ROS artışına bağlı olarak fenthionun oksidatif potansiyelini indüklediği düşünülmektedir. PBO'nun *O. niloticus*'da piretroid pestisid lambda-cyhalothrinin oksidatif stres oluşturma potansiyelini GSH ve GSH bağımlı enzimler ve stres proteinlerini etkileyerek artırdığı bildirilmiştir (Piner, 2009). PBO etkisinde sıçan karaciğerinde CYP1A1 gen ekspresyonundaki artışın, mikrozomal oksidasyonun yan ürünü olan ROS artışına neden olabileceğini belirlenmiştir (Muguruma ve ark., 2007). PBO etkisinde Nrf-2 indüksiyonu ile GSH sentezinden sorumlu γ -GCS enziminin katalitik ünitesinin ve GS enziminin ekspresyonunda artış olduğunu belirlenmiştir (Ellinger-Ziegelbauer ve ark. 2005).

Glutatyon redüktaz GSH'm sitosolik derişiminin sabit tutulmasını sağlayan enzimdir ve GR aktivitesi oksidatif stres markırı olarak değerlendirilmektedir (Stegeman ve ark., 1992). Bu çalışmada uzun süreli etkide fenhinonun tek başına GR aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. Fenthionun oksidatif etkilerinin giderilmesi için GR aktivitesindeki bu artış ile GSSG'nin GSH'a redüksiyonu artırılarak GSH/GSSG

oranı sabit tutulmaya çalışılmıştır. *C. carpio*'da bütaklor etkisinde GR aktivitesindeki indüksiyonun GSSG ve GSH arasındaki dengenin tekrar kazanılması için olduğu bildirilmiştir (Tramboo ve ark., 2011).

Glutasyon S-transferazlar bazı aktivasyon tepkimeleri dışında çok geniş alandaki kimyasal gruplarının detoksifikasyonunu sağlayan bir enzim ailesidir (Eaton ve Bammler, 1999). GST lipid peroksidasyonunun parçalanma ürünleri gibi elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu da katalizler (Cnubben ve ark., 2001). Bu çalışmada kısa süreli fenthion etkisinde GST inhibisyonu nedeniyle lipid peroksidasyonunun arttığı ve uzun süreli etkide artan GST aktivitesine bağlı olarak lipid peroksidlerin detoksifiye edilebildiği düşünülmektedir. Ancak fenthionun PBO ile birlikte etkisinde GST aktivitesinin oksidatif etkinin artışına bağlı olarak lipid peroksidasyonundan koruyamadığı belirlenmiştir. Sıçanda OP fenitrothion (%25), piretroid lambda cyhalothrin (%2.5), PBO (%6) karışımı beyinde uzun süreli etkide GST aktivitesinde azalışa neden olmuştur (El-Demerdash, 2011). OP diazinon etkisinde *C. carpio*'da karaciğer dokusunda GST aktivitesi ve lipid peroksidasyonunun arttığı bildirilmiştir (Üner ve ark., 2007). *O. niloticus*'da karaciğer dokusunda fenthionun GST aktivitesinde artışa neden olduğu, lipid peroksidasyonunu etkilemediği, böbrek dokusunda ise lipid peroksidasyonunu artırdığı GST aktivitesinin ise değişmediği bildirilmiştir (Sevgiler ve Üner, 2010).

Uzun süreli etkide fenthionun tek başına ve PBO ile birlikte etkisinde HSP70 miktarının arttığı belirlenmiştir. HSP70 ailesi ağır metaller, toksik organokimyasallar gibi ksenobiyotiklerin etkisinde stres proteinleri içinde en çok indüklenen grup olarak bilinmektedir (Schröder ve ark. 1999). *D. rerio* larvalarında nikel klorid ve chlorpyrifosun birlikte ve tek uygulamalarında HSP70 düzeyinde artış belirlenmiştir (Scheil ve ark., 2010). Sentetik piretroid deltamethrin etkisinde *O. mykiss*'de kas dokusunda *hsp70* gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir (Atamanalp ve Erdoğan, 2010). Serbest radikallerin protein oksidasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Berlett ve Stadtman, 1997). Moleküler şaperon olarak HSP'lerin doğal konformasyonunda olmayan proteinlerin doğal konformasyonlarına dönüşümü, protein agregatlarının yıkımı ve hücreden uzaklaştırılmasında görev aldığı bilinmektedir (Feder ve Hoffman, 1999). Bu çalışmada HSP70 miktarındaki artışın

fenthion ve PBO etkisinde artan serbest radikallere bağlı olarak oksidatif stresle sonuçlanan protein oksidasyonuna karşı hücreyi korumak için olduğu düşünülmektedir. Sıçanlarda alachlor, endrin, chlorpyrifos ve fenthion etkisinde karaciğer ve beyin dokusunda *hsp89α* ve *hsp89β* gen ekspresyonlarının arttığı ve bu genlerin pestisid etkisinde oluşan oksidatif stresten korunmada rol alabileceği bildirilmiştir (Bagchi ve ark., 1996). *Drosophila melanogaster*'de benzen, toluen ve ksilen etkisinde ROS miktarının, SOD, CAT, GST aktivitesinin, lipid peroksidasyonunun ve buna bağlı olarak da *hsp70*, *hsp60*, *hsp83* ve *hsp26* gen ekspresyonlarının indüklendiği bildirilmiştir (Singh ve ark., 2009).

AChE nörotransmitter madde olarak görev yapan ACh'nin kolin ve asetik asite hidrolizinden sorumlu bir enzimdir (Pope ve ark., 2005) ve balıklarda OP kirlenmesinin başlıca biyomarkırı olarak değerlendirilmektedir (Pan ve Dutta., 1998; Ferrari ve ark., 2004; Durmaz ve ark., 2006). *D. rerio*' da beyin dokusunda OP metil parathion etkisinde AChE aktivitesinin zamana bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Huang ve ark., 2011). *O. niloticus*'da OP metil parathionun plazma AChE ve BChE inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Barbieri ve Ferreira., 2011).

Fenthion, AChE enzimini inhibe ederek kolinerjik sinapsların post sinaptik zarlarının kalıcı depolarizasyonuna ve sonunda hayvanların felç olmasına ve ölümüne neden olabilmektedir (Costa, 2006). Fenthionun *O. niloticus*'da karaciğer ve böbrek dokularında AChE ve BChE inhibisyonuna, beyin dokusunda ise AChE inhibisyonuna neden olduğu ve bu dokuda BChE aktivitesinin belirlenemediği bildirilmiştir (Üner ve ark., 2010).

Fenthion okson formuna kolayca dönüşmediği için daha güvenli bir pestisid olarak geliştirilmiştir (Roberts ve Hutson, 1999) ancak *C. auratus*'da fenthionun okson formuna dönüşerek yüksek derecede toksik etkiye neden olduğu bulunmuştur (Kitamura ve ark., 2000). OP bileşiklerin oksidasyon ürünleri toksisitesi yüksek antikolinesteraz bileşiklerdir (Jokanovic, 2001). Fenthion balıklarda fenthion oksona desülfüre edilebilmektedir ve fenthion okson kuvvetli AChE inhibitörü olarak etki göstermektedir (Kitamura ve ark., 2000). Fenthion sülfoksit fenthiondan daha düşük oranda AChE inhibisyonuna neden olurken (Furnes ve Schlenk, 2004) fenthion oksonun daha güçlü bir inhibitör olduğu bildirilmiştir (Gadepalli ve ark., 2007). Bu

çalışmada fenthion tek başına tüm sürelerde AChE inhibisyonuna neden olurken, PBO ile birlikte uygulamasında kısa süreli etkide AChE inhibisyonu oluşmadığı ancak uzun süreli etkide AChE inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. Bu durumun PBO varlığında fenthionun biyotransformasyonuna bağlı olarak kuvvetli AChE inhibitörü olarak değerlendirilen fenthion oksondan daha çok diğer metabolitlere dönüşmesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

O. mykiss ve *Oncorhynchus kisutch*'da fenthionun karaciğer mikrozoamlarında biyotransformasyonu sonucunda fenthion sülfoksid, fenthion okson ve 3-metil-4(metiltiyo)-fenol oluştuğu ve fenthionun başlıca metabolitinin bu iki balık türünde 3-metil-4(metiltiyo)-fenol olduğu, fenthion oksonun ise en az miktarda oluşturulan metabolit olduğu bildirilmiştir (Lavado ve Schlenk., 2011). Birlikte uygulamalarında uzun süreli etkide belirlenen inhibisyonun ise fenthion okson gibi daha kuvvetli AChE inhibisyonuna neden olan metabolitlerin birikimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthionun uygulanan derişimde kısa süreli etkide lipid peroksidasyonundaki artışla, uzun süreli etkide ise HSP70 miktarındaki artışla oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.
2. Fenthionun neden olduğu oksidatif stres etkisi GSH-bağımlı antioksidant sistem tarafından giderilememiştir.
3. *O. niloticus*'da beyin dokusunda fenthionun uygulanan derişimde kısa ve uzun süreli etkide AChE inhibisyonuna neden olarak nörotoksik etkiler oluşturduğu belirlenmiştir.
4. Modülatör olarak kullanılan PBO'nun fenthionun oksidatif stres oluşturma etkisini artırdığı ve AChE inhibisyon etkisini azalttığı bulunmuştur.
5. Fenthionun, tek başına ve PBO ile birlikte HSP70 indüksiyonuna neden olduğu ve bu artışın oksidatif etkileri azaltmaya yönelik olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular;

1. Fenthion ve PBO'nun *O. niloticus*'da beyin dokusunda GSH metabolizması, stres proteinleri ve lipid peroksidasyonuna etkileri ile ilgili yeni bilgiler sağlayarak biyokimyasal toksikoloji alanında bilime katkı sağlayacaktır.
2. Fenthion ve PBO'nun *O. niloticus*'da beyin dokusunda AChE inhibisyonu ile ilgili yeni bilgiler sağlayarak OP pestisid toksisitesi konusunda biyokimyasal toksikoloji alanında bilime katkı sağlayacaktır.
3. Ülkemizde ve yurt dışında kirlilik izleme programları ve ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmalarında kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- ABDOLLAHI, M., RANJBAR, A., SHADNIA, S., NIKFAR, S., REZAIIE, A., 2004. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitor*, 10: 141-147.
- ANDERSON, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology*, 113: 548-555.
- ANKLEY, G.T., DIERKES, J.R., JENSEN, D.A., PETERSON, G.S., 1991. Piperonyl butoxide as a tool in aquatic toxicological research with organophosphate insecticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21: 266-274.
- APEL, K., HIRT, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Reviews Plant Biology*, 55: 373–99.
- APHA, AWWA, WEF, 1998. *Standard Methods*. American Public Health Association, New York, 1085s.
- ATAMANALP, M., ERDOGAN, O., 2010. Alterations of HSP70 gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to deltamethrin. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 34: 359-363.
- ATIF, F., PARVEZ, S., PANDEY, S., ALI, M., KAUR, M., REHMAN, H., KHAN, H.A., RAISUDDIN, S., 2005. Modulatory effect of cadmium exposure on deltamethrin-induced oxidative stress in *Channa punctata* Bloch. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49: 371-377.
- BAGCHI, D., BHATTACHARYA, G., STOHS, S.J., 1996. *In vitro* and *in vivo* induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. *Toxicology*, 112: 57-68.
- BANERJEE, B.D., SETH V., BHATTACHARYA, A., PASHA, S.T., CHAKRABORTY, A.K., 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33–47.

- BANVALFI, G., 2011. Cellular changes in mammalian cells induced by cadmium. (BANVALFI, G., Edts.). Genotoxic effects of heavy metals. Springer Dordrecht Heidelberg London, New York, USA. 147-162.
- BARBIERI, E., FERREIRA, L.A.A., 2011. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600 on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Pesticide Biochemistry and Physiology, 99: 209-214.
- BECKER, K., HEROLD-MENDE, C., PARK, J. J., LOWE, G., SCHIRMER, R.H., 2001. Human Thioredoxin Reductase is efficiently inhibited by (2,2':6',2"-Terpyridine) platinum (II) complexes. Possible implications for a novel antitumor strategy. Journal of Medical Chemistry, 44: 2784-2792.
- BENJAMIN, I.J., MCMILLAN, D.R., 1998. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. Circulation Research, 83: 117-132.
- BERLETT, B.S., STADTMAN, E., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. The Journal of Biological Chemistry, 272: 20313-20316.
- BEUTLER, E., 1984. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods, 2nd edition. Grune and Starton, New York, 160s.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- CABRAS, P., GARAU, V.L., MELIS, M., PIRISI, F.M., SPANEDDA, L., 1993. Persistence and fate of fenthion in olives and olive products. Journal Agriculture Food Chemical, 41: 2431-2433.
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. Journal of Biological Chemistry, 25: 5475-5480.
- CASAS, J., SANTERRE, A., GIRON, P.M.I., REYNOSO, O.R., ZAITSEVA, G., 2007. Comparative study of phagocytic activity and lymphoproliferative response in five varieties of tilapia (*Oreochromis spp.*). Journal of Fish Biology, 71: 1541-1545.

- CASIDA, J.E., GAMMON, D.E., GLICKMAN, A.H., LAWRENCE, L.J., 1983. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology*, 23: 413-438.
- CASTILLO, C.G., MONTANTE, M., DUFOUR, L., MARTINEZ, M.L., JIMENEZ-CAPDEVILLE, M.E., 2002. Behavioral effects of exposure to endosulfan and methyl parathion in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 24: 797–804.
- CEYHUN, S.B., SENTÜRK, M., EKINCI, D., ERDOGAN, O., CILTAŞ, A., KOCAMAN, E. M., 2010. Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 152: 215–223.
- CHAUHAN, A., CHAUHAN, V., 2006. Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, 13:171–181.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., VAN ZANDEN, J., VAN BLADEREN, P.J., 2001. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- COSTA L, G., 2006. Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366: 1-13.
- CURRIE, S., TUFTS, B.L., MOYES, C.D., 2002. Influence of bioenergetic stress on heat shock protein gene expression in nucleated red blood cells of fish. *Journal Expression Biology*, 205: 2237-2249.
- DAILIANIS, S., DOMOUHTSIDOU, G.P., RAFTOPOULOU, E., KALOYIANNI, M., DIMITRIADIS, V.K., 2003. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 56: 443–470.
- DAS, B.K., MUKHERJEE, S.C., 2000. Chronic toxic effects of quinalphos on some biochemical parameters in *Labeo rohita* (Ham.). *Toxicology Letters*, 114: 11–18.
- DE BOECK, G., DE WACHTER, B., VLAEMINCK, A., BLUST, R., 2003. Effect of cortisol treatment and/or sublethal copper exposure on copper uptake and

- heat shock protein levels in common carp, *Cyprinus carpio*. Environmental Toxicology and Chemistry, 22: 1122–1126.
- DEANE, E.E., WOO, N.Y.S., 2005. Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. Biochemical and Biophysical Research Communications, 330: 776-783.
- DEMBELE, K., HAUBRUGE, E., GASPAR, C., 2000. Concentration effects of selected insecticides on brain acetylcholinesterase in the common carp (*Cyprinus carpio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 45: 49-54.
- DINU, D., MARINESCU, D., MUNTEANU, M.C., STAIUCU, A.C., COSTACHE, M., DINISCHIOTU, A., 2010. Modulatory Effects of deltamethrin on antioxidant defense mechanisms and lipid peroxidation in *Carassius auratus gibelio* liver and intestine. Environmental Contamination Toxicology, 58: 757–764.
- DURMAZ, H., SEVGILER, Y., ÜNER, N., 2006. Tissue-specific antioxidative and neurotoxic responses to diazinon in *Oreochromis niloticus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 84: 215–226.
- DWIVEDI, P. D., DAS, M., KHANNA, S. K., 1998. Role of Cytochrome P-450 in quinalphos toxicity: Effect on hepatic and brain antioxidant enzymes in rats. Food and Chemical Toxicology, 36: 437-444.
- EATON, D.L., BAMMLER, T.K., 1999. Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. Toxicology Science, 49: 156-164.
- EL-DEMERDASH, F.M., 2011. Lipid peroxidation, oxidative stress and acetylcholinesterase in rat brain exposed to organophosphate and pyrethroid insecticides. Food and Chemical Toxicology, 49: 1346–1352.
- ELLINGER-ZIEGELBAUER, H., STUART, B., WAHLE, B., BOMANN, W., AHR, H.J., 2005. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. Mutation Research, 575: 61-84.

- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- EL-MERHIBI, A., KUMAR, A., SMEATON, T., 2004. Role of piperonyl butoxide in the toxicity of chlorpyrifos to *Ceriodaphnia dubia* and *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 202–212.
- ELNWISHY, H.N., AHMED, M.T., EL-SHERIF, M.S., EL-HAMEED, M.A., 2007. The Effect of diazinon on glutathine and acetylcholinesterase in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Agriculture and Social Sciences*, 3: 52–54.
- EPA, 2001. Fenthion Facts. United States Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances (750 8C). EPA 738-F-00-011.
- EPA, 2002. Pesticides Industry Sales and Usage. 1998 and 1999 Market Estimates. United States Environmental Protection Agency.
http://www.epa.gov/pesticides/pestsales/01pestsales/market_estimates2001.
- EPA, 2006a. Fenthion; product registrations cancellation order. United States Environmental Protection Agency. OPP-2003-0333; FRL-7324-2.
- EPA, 2006b. Reregistration Eligibility Decision for Piperonyl Butoxide(PBO). United States Environmental Protection Agency
- ERICKSON, D.A., GOODRICH, M.S., LECH, J.J., 1988. The effect of piperonyl butoxide on hepatic cytochrome P450-dependent monooxygenase activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 94: 1-10.
- ESTERBAUER, H., CHEESEMAN, K.H., DIANZANIT M.U., POLIT, G., SLATERT, T.F. 1982. Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochemical Journal*, 208: 129-140.
- FANG, Y., SHENG, Y., GUOYAO, W., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18: 872– 879.

- FEDER, M.E., HOFMANN, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology*, 61: 243-282.
- FERRARI, A., VENTURINO, A., PECHEN DE DANGELO, A.M., 2004. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 420-425.
- FIGUEIREDO-FERNANDES, A., FONTAINHAS-FERNANDES, A., PEIXOTO, F., ROCHA, E., REIS-HENRIQUES, M.A., 2006. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 97-103.
- FINKEL, T., HOLBROOK, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*, 408: 239-247.
- FORMAN, H. J., ZHANG, H., RINNA, A., 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30: 1-12.
- FORTUNATO, J.J., FEIER, G., VITALI, A.M., PETRONILHO, F.C., DAL-PIZZOL, F., QUEVEDO, J., 2006. Malathion-induced oxidative stress in rat brain regions. *Neurochemical Research*, 31: 671-678.
- FRANKLIN, T. B., KRUEGER-NAUG, A.M., CLARKE, D.B., ARRIGO, A.P., CURRIE R. W., 2005. The role of heat shock proteins Hsp70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *International Journal of Hyperthermia*, 21: 379-392.
- FULTON, M.H., KEY, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20: 37-45.
- FURNES, B., SCHLENK, D., 2004. Evaluation of xenobiotic *N*- and *S*-oxidation by variant flavin-containing monooxygenase 1 (FMO1) enzymes. *Toxicology Science*, 78: 196-203.
- GADEPALLI, R.S., RIMOLDI, J.M., FRONCZEK, F.R., NILLOS, M., GAN, J., DENG, X., RODRIGUEZ- FUENTES, G., SCHLENK, D., 2007. Synthesis of

- fenthion sulfoxide and fenoxon sulfoxide enantiomers: Effect of sulfur chirality on acetylcholinesterase activity. *Chemical Research in Toxicology*, 20: 257-262.
- GALGANI, F., BOCQUENÉ, G., 2000. Molecular biomarkers of exposure of marine organisms to organophosphorus pesticides and carbamates, in Use of biomarkers for environmental quality assessment, (L., Lagadic, T., Caquet, J.C., Amiard, F., Ramade, Edts.). Use of biomarkers for environmental quality assessment, Elsevier Science Publisher, Enfield, USA. 113–137.
- GERHARD, G. S., 2007. Small laboratory fish as models for aging research. *Ageing Research Reviews*, 6: 64–72.
- GRIFFITH, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Analytical Chemistry*, 106: 207-212.
- GUHATHAKURTA, S., BHATTACHARYA, S., 1988. Target and nontarget actions of phenthoate and carbofuran: brain acetylcholinesterase, kidney iodide peroxidase and blood thyroxine profiles in *Channa punctatus*. *Biomedical and Environmental Sciences*, 1: 59-63.
- GUIMARAES, A.T.B., SILVA DE ASSIS, H.C., BOEGER, W., 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 57–62.
- GUPTA, A., GUPTA, A., SHUKLA, G.S., 1998. Effects of neonatal quinalphos exposure and subsequent withdrawal on free radical generation and antioxidative defenses in developing rat brain. *Journal of Applied Toxicology*, 18: 71–77.
- GUTTERIDGE, J.M.C., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinic Chemical*, 41: 1819-1 828.
- HABIG, W.H., PABST, M.J., JAKOBY, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7139.

- HAI, D.Q., VARGA, S.I., MATKOVICS, B., 1997. Organophosphate effects on antioxidant systems of *Cyprinus carpio* and *Ictalurus nebulosus*. *Biochemical Physiology*, 117: 83-88.
- HAZARIKA, A., SARKAR, S.N., HAJARE, S., KATARIA, M., MALIK, J.K., 2003. Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: A Biochemical interaction study. *Toxicology*, 185: 1-8.
- HODGSON, E., LEVI, P.E., 1998. Interactions of piperonyl butoxide with cytochrome P450, (D.G. Jones, Editor). *Piperonyl Butoxide: The Insecticide Synergist*. Academic Press, London, s 1-41.
- <http://www.abcbirds.org/pesticides/profiles/fenthion.html>
- HUANG, Q.Y., HUANG, L., HUANG, H.Q., 2011. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 153: 67-74.
- IWAMA, G.K., THOMAS, P.T., FORSYTH, R.B., VIJAYAN, M.M., 1998. Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8: 35-56.
- IWAMA, G.K., VIJAYAN, M.M., FORSYTH, R.B., ACKERMAN, P.A., 1999. Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish. *American Zoology*, 39: 901-909.
- JOKANOVIC, M., 2001. Biotransformation of organophosphorous compounds. *Toxicology*, 166: 139-160.
- KALMAR, B., GREENSMITH, L., 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 310–318.
- KARALLIEDDE, L., 1999. Organophosphorus poisoning and anaesthesia. *Anaesthesia*, 54: 1073-1088.
- KELLY, S., 1998. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems. *Environmental Health Perspectives*, 3: 114-127.
- KETTERER, B., 2001. A bird's eye view on the glutathione transferase field. *Chemical Biology Interactions*, 138: 27-42.

- KINNEAR, P.R., GRAY, C.D., 1995. SPSS for Windows Made Simple. Lawrence Erlbaum Associates, East Sussex, UK, 275s.
- KITAMURA, S., KADOTA, T., YOSHIDA M., JINNO, N., OHTA, S., 2000. Whole-body metabolism of the organophosphorus pesticide, fenthion, in goldfish, *Carassius auratus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 126: 259-266.
- KLAPER, R., REES, C.B., DREVNICK, P., WEBER, D., SANDHEINRICH, M., CARVAN, M.J., 2006. Gene Expression changes related to endocrine function and decline in reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*) after dietary methylmercury exposure. Environ Health Perspective, 114:1337–1343.
- KNAPEN, M.D., MAARTEN, F.C.M., 2000. The glutathione / glutathione-related enzyme system in reproduction. European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 91: 127-129.
- KREGEL, K.C., 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. Journal Applied Physiology, 92: 2177-2186.
- KUMAR, A., RAI, D.K. , SHARMA, B., PANDEY, R.S., 2009. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced *in vivo* alterations in the activity of acetylcholinesterase in a freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). Pesticide Biochemistry and Physiology, 93: 96–99.
- LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Research, 46: 244–282.
- LAMBROPOULOU, D.A. ALBANIS, T.A., 2002. Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. Journal Agricultural Food Chemiccal, 50: 3359-3365.
- LANDI, S., 2004. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. Mutation Research, 463: 247–283.

- LAVADO, L., SCHLENK D., 2011. Microsomal biotransformation of chlorpyrifos, parathion and fenthion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): mechanistic insights into interspecific differences in toxicity. *Aquatic Toxicology*, 101: 57-63.
- LEWIS, S., HANDY, R.D., CORD, B., BILLINGHURST, Z., DEPLEDGE, M.H., 1999. Stress proteins (HSP's): Methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 8: 351-368.
- LI, W., YIN, D., ZHOU, Y., HU, S., WANG, L., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 251–255.
- LI, Y.A., GUERRERO, F.D., PRUETT, J.H., 2007. Involvement of esterases in diazinon resistance and biphasic effects of piperonyl butoxide on diazinon toxicity to *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 147–155.
- LIMON-PACHECO, J., GONSEBATT, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research*, 674: 137–147.
- LIVINGSTONE, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42: 656-666.
- LOTTI, M., 1995. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clinical Chemistry*, 41: 1814-1818.
- MADUENHO, L.P., MARTINEZ, C.B.R., 2008. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 148: 265-272.
- MARRS, K.A., 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Reviews Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47: 127–158.
- MLAMBO, S.S., VAN VUREN, J.H.J., BASSON, R., GRANT, B., 2010. Accumulation of hepatic Hsp70 and plasma cortisol in *Oreochromis*

- mossambicus* following sublethal metal and DDT exposure. African Journal of Aquatic Science, 35: 47–53.
- MOLINARI, G.P., CAVANNA, S., FERRONI, B., 1998. Multiresidue method for determination of organophosphorus pesticides in vegetables. Food Additive and Contamination, 15: 510-7.
- MONTEIRO D.A., ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology, 143:141–149
- MONTEIRO, D.A., ALMEIDA, J.A., RANTIN, F.T., KALININ, A.L., 2009. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology, 149: 40–49.
- MUGURUMA, M., UNAMI, A., KANKI, M., KUROIWA, Y., NISHIMURA, J., DEWA, Y., UMEMURA, T., OISHI, Y., MITSUMORI, K., 2007. Possible involvement of oxidative stress in piperonyl butoxide induced hepatocarcinogenesis in rats. Toxicology, 236: 61-75.
- MULLIE, W.C., DIALLO, A.O., GADJI, B., NDIAYE, M.D., 1999. Environmental hazards of mobile ground spraying with cyanophos and fenthion for quelea control in Senegal. Ecotoxicology and Environmental Safety, 43: 1-10.
- NOBLE, A., 1993. Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides. Journal of Chromatography, 642: 3-14.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., TAGI, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Chemistry, 95: 351-358.
- PAN, G., DUTTA, H.M., 1998. The inhibition of brain acetylcholinesterase activity of juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by sublethal concentrations of diazinon. Environmental Research, 79: 133-137.
- PANDEY, S., AHMAD, I., PARVEZ, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., RAISUDDIN, S., 2001. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch. 1. Protection against lipid peroxidation in liver

- by copper pre-exposure. Archives of Environment Contamination and Toxicology, 41: 345-52.
- PATHIRATNE, A., GEORGE, S.G., 1998. Toxicity of malathion to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* and modulation by other environmental contaminants. Aquatic Toxicology, 43: 261-271.
- PAUL, E.A., SIMONIN, H.A., TOMAJER, T.M., 2005. A comparison of the toxicity of synergized and technical formulations of permethrin, sumithrin, and resmethrin to trout. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48: 251-259.
- PEIXOTO, F., ALVES-FERNANDES, D., SANTOS, D., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., 2006. Toxicological effects of oxyuorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 85: 91–96.
- PENA-LLOPIS, S., PENA, J.B., SANCHO, E., FERNANDEZ-VEGA, C., FERRANDO, M.D., 2001. Glutathione-dependent resistance of the European eel *Anguilla anguilla* to the herbicide molinate. Chemosphere, 45: 671-681.
- PENA-LLOPIS, S., FERRANDO, M.D., PENA, J.B., 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. Aquatic Toxicology, 65: 337-360.
- PINER, P., 2005. Fenthion içeren ortamda BSO ve NAC'nin *Oreochromis niloticus*'da beyin dokusunda glutatyon metabolizması, lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesteraz aktivitesine etkileri. Ç. Ü. Fen Edebiyet Fakültesi – Yüksek Lisans Tezi, 112 sayfa.
- PINER, P., SEVGILER Y., ÜNER N., 2007. *In vivo* effects of fenthion on oxidative processes by the modulation of glutathione metabolism in the brain of *Oreochromis niloticus*. Environmental Toxicology, 22: 605–612.
- PINER, P., 2009. Lambda-cyhalothrinin *Oreochromis niloticus*'da karaciğerde piperonil bütoksit modülatörlüğünde oksidatif stres potansiyelinin belirlenmesi, stres proteinleri ve apoptozis üzerine etkileri. Ç. Ü. Fen Edebiyet Fakültesi – Doktora Tezi, 92 sayfa.

- POON, H. F., CALABRESE, B.S.V., SCAPAGNINI, G., BUTTERFIELD, D.A.,
2004. Free radicals and brain aging. *Clinics Geriatric Medicine*, 20: 329-359.
- POPE, C., KARANTH, S., LIU, J., 2005. Pharmacology and toxicology of
cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action.
Environmental Toxicology and Pharmacology, 19: 433-446.
- PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A., 1995. Mechanisms of free
radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30: 2290–2787.
- RAI, D.K, SHARMA, B., 2007. Carbofuran induced oxidative stress in mammalian
brain. *Molecular Biotechnology*, 37: 66-71.
- REHMAN, H., ALI, M., ATIF, F., KAUR, M., BHATIA, K., RAISUDDIN, S.,
2006. The modulatory effect of deltamethrin on antioxidants in mice. *Clinica
Chimica Acta*, 369: 61-65.
- ROBERTS, T.R., HUTSON, D.H., 1999. *Metabolic Pathways of Agrochemicals:
Part 2: Insecticides and Fungicides*. The Royal Society of Chemistry,
Cambridge, UK, 326-331.
- RYU, D.Y., LEVI, P.E, FERNANDEZ-SALGUERO, P., GONZALEZ, F.J.,
HODGSON, E., 1996. Piperonyl butoxide and acenaphthylene induce
cytochrome P450 1A2 and 1B1 mRNA in aromatic hydrocarbon-responsive
receptor knock-out mouse liver. *Molecular Pharmaceutics*, 50: 443-446.
- SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R.,
RAISUDDIN, S., 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to
deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and
Environmental Safety*, 56: 295–301.
- SCHEIL, V., KIENLE, C., OSTERAUER, R., GERHARD, A., KOHLER, H.R.,
2009. Effects of 3,4-dichloroaniline and diazinon on different biological
organisation levels of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae.
Ecotoxicology, 18: 355–363.
- SCHEIL, V., ZURN, A., KOHLER, H.R., TRIEBSKORN, R., 2010. Embryo
development, stress protein (Hsp70) responses, and histopathology in
zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to nickel chloride, chlorpyrifos,
and binary mixtures of them. *Environmental Toxicology*, 25: 83–93.

- SCHRÖDER, H.C., BATEL, R., HASSANEIN, H.M.A., LAUENROTH, S., JENKE, H.S., SIMAT, T., STEINHART, H., MULLER, W.E.G., 2000. Correlation between the level of the potential biomarker, heat-shock protein, and the occurrence of DNA damage in the dab *Limanda limanda*: a field study in the North Sea and the English Channel. *Marine Environmental Research*, 49: 201-215.
- SELVAKUMAR, S., GERALDINE, P., SHANJU, S., JAYAKUMAR, T., 2005. Stressor-specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82: 125-132.
- SEVGILER, Y., PINER, P., ÜNER, N., 2007. Effects of *N*-acetylcysteine on oxidative responses in the liver of fenthion exposed *Cyprinus carpio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87: 248-254.
- SEVGILER, Y., ÜNER, N., 2010. Tissue-specific effects of fenthion on glutathione metabolism modulated by NAC and BSO in *Oreochromis niloticus*. *Drug and Chemical Toxicology* 33: 348-356.
- SHARP, F.R., MASSA, S.M., SWANSON, R.A., 1999. Heat shock protein protection. *Research New*, 22: 97-99.
- SHELLEY, L.K., BALFRY, S.K., ROSS, P.S., KENNEDY, C.J., 2009. Immunotoxicological effects of a sub-chronic exposure to selected current-use pesticides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 92: 95–103.
- SIEGFRIED, B.D., M.E. SCHARF, 2001. Mechanisms of organophosphate resistance in insects, (I., Ishaaya, Edts.). *Biochemical Sites of Insecticide Action and Resistance*, Springer-Verlag, Berlin, Germany. 269-287.
- SINGH, M.P., REDDY, K.M.M., MATHUR, N., SAXENA, D.K., CHOWDHURI, D.K., 2009. Induction of *hsp70*, *hsp60*, *hsp83* and *hsp26* and oxidative stress markers in benzene, toluene and xylene exposed *Drosophila melanogaster*: Role of ROS generation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 235: 226-243.

- SOENGAS, J.L., ALDEGUNDE, M., 2002. Energy metabolism of fish brain. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 131: 271-296.
- SOHAL, R.S., MOCKETT, R.J., ORR, W.C., 2002. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 33: 575–586.
- SOLE, J., HUGUET, J., AROLA, L., ROMEU, A., 1990. *In vivo* effects of nickel and cadmium in rats on lipid peroxidation and ceruloplasmin activity. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology*, 44: 686–691.
- SOREQ, H., ZAKUT, H., 1993. Human acetylcholinesterases and anticholinesterases. *The American Society of Human Genetics*, 55: 593-594.
- STEGEMAN J.J., BROUWER, M., DI GULIO, R.T., FORLIN, L., FOWLER, B. A., SANDERS, B. M., VAN VELD, P.A., 1992. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect. (R.J., Huggett, R. A., Kimerle, Jr, P.M., Mehrie, H.L., Bergman, Edts.) *Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, USA. 235-336.
- STRAUS, D.L., CHAMBERS, J.E., 2006. Effects of piperonyl butoxide on the metabolism of DEF (S,S,S-Tributyl Phosphorotrithioate) in fingerling channel catfish. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 16: 235-239.
- SZABÓ, A., NEMCSÓK, J., ASZTALOS, B., RAKONCZAY, Z., KÁSA, P., HIEU, L. H., 1992. The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L). acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23: 39-45.
- TAKAHASHI, O., OISHI, S., FUJITANI, T., TANAKA, T., YONEYAMA, M., 1997. Chronic toxicity studies of piperonyl butoxide in CD-1 mice: induction of hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 124: 95-103.
- TRAMBOO, S.M., YOUSUF, A.R., AKBAR, S., 2011. Oxidative stress-inducing potential of butachlor in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 93: 285-295.
- TUOVINEN, K., 2004. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. *Toxicology*, 196: 31–39.

- ÜNER, N., SEVGILER, Y., DURMAZ, H., PINER, P., CINKILOGLU, E., 2009. *N*-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of *Cyprinus carpio* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 150: 33-38.
- ÜNER, N., SEVGILER, Y., PINER, P., DURMAZ, H., 2008. Modulation of fenthion- induced oxidative effects by BSO in the liver of *Cyprinus carpio* L. *Drug Chemical Toxicology*, 31: 353–369.
- ÜNER, N., SEVGİLER, Y., PİNER, P., 2010. Tissue-Specific *in vivo* inhibition of cholinesterases by the organophosphate fenthion in *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology*, 25: 391–399.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M., SCOULLOS, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178–189.
- VALE, J.A., 1998. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*, 102,103: 649-652.
- VALKO, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40.
- VAN DE POLL, M.C.G., SOETERS, P.B., DEUTZ, N.E.P., FEARON, K.C.H., DEJONG, C.H.C. 2008. Renal amino acid metabolism: its role in inter-organ amino acid and nitrogen. General Introduction. (C.H.C. Dejong, P.B. Soeters Edts.) Exchange nitrogen metabolism and hepatocellular injury during liver resection. San Diego: Academic Press, USA. 8-21.
- WELLS, P.G., MCCALLUM, G.P., CHEN, C.S., HENDERSON, J.T., LEE, C.J. J., PERSTIN, J., PRESTON, T.J., WILEY, M.J., WONG, A.W., 2009. Oxidative stress in developmental origins of disease: Teratogenesis, neuro developmental deficits and cancer. *Toxicological Sciences*, 108: 4-18.
- WELLS, P.G., KIM, P.M., LAPOSA, R.R., NICOL, C.J., PARMAN, T., WINN, L.M., 1997. Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutation Research*, 396: 65–78.

- WERNER, I., GEIST, J., OKIHIRO, M., ROSENKRANZ, P., HINTON, D.E., 2002. Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research*, 54: 609-614.
- WILLIAMS, J.H., FARAG, A.M., STANSBURG, M.A., YOUNG, P.A., BERGMAN, H.C., PETERSEN, N.S., 1996. Accumulation of HSP70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and or diet. *Environmental Toxicology Chemical*, 15: 1324-1328.
- YOUNES, M., 1999. Free radicals and reactive oxygen species. In *Toxicology*, (H. Marquardt, S.G. Schafer, R. McCellan, and F. Welsch, Edts.) Academic Press New York, USA. 111–24.
- ZUTSHI, B., MURTHY, P.S., 2001. Ultrastructural changes in testis of gobiid fish *Glossogobius giuris* (Ham) induced by fenthion. *Indian Journal of Experimental Biology*: 39, 170–173.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Adana'da doğdu. İlköğretim ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2004-2008 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans öğrenimini tamamlayarak Biyolog ünvanı ile mezun oldu ve aynı yıl Yüksek Lisans programına başladı.