

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**Dİ-(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT'ın *Gammarus pulex*'de
OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTENİN
HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÖMER ŞAMASAS**

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM
İKİNCİ DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK**

TUNCELİ – 2019

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Dİ-(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT'ın *Gammarus pulex*'de
OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTENİN
HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖMER ŞAMASAS

(11881052)

Anabilim Dalı: Çevre Mühendisliği

DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuran ÇIKCIKOĞLU YILDIRIM

İKİNCİ DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK

TUNCELİ – 2019

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Dİ-(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT'ın *Gammarus pulex*'de
OLUŞTURDUĞU TOKSİSİTENİN
HİSTOPATOLOJİK ve BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

**ÖMER ŞAMASAS
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 11/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği/oyçokluğu** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Doç. Dr. Nuran
CIKCIKOĞLU YILDIRIM
(Munzur Üniversitesi)

DANIŞMAN

İmza:.....

Doç.Dr. E. Işıl ARSLAN
TOPAL
(Fırat Üniversitesi)

ÜYE

İmza:.....

Doç. Dr. Mehtap TANYOL
(Munzur Üniversitesi)

ÜYE

Bu tez, Enstitümüz Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Numan YILDIRIM
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: YLMUB018-07

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı “Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu”ndaki hükümlere tabidir

Di-(2-Etilhekzil) Fitalat'ın *Gammarus Pulex*'de Oluşturduğu Toksisitenin Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak İncelenmesi

ÖZET

Fitalatlar, plastik malzemelerin sertliğini azaltmak, malzemelere esneklik ve yumuşaklık kazandırmak için katılan kimyasal maddelerdir. Günümüzde birçok kozmetik üründe, deterjan, oyuncak ve kişisel bakım ürünleri gibi günlük hayatta kullanılan ürünlerde de kalıcı koku ve renklendirme amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan bu tez çalışması ile Di-(2-Etilhekzil) Fitalat (DEHP)'in farklı dozlarına maruz kalan *Gammarus pulex*'de biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler incelenerek DEHP'in neden olduğu toksisitenin ortaya konulması amaçlanmaktadır.

Bu amaç doğrultusunda öncelikli olarak DEHP'in LC₅₀ (letal konsantrasyon 50) değeri statik bir test kullanılarak belirlenmiştir. DEHP LC değeri 0,079±0,01 ppm olarak tespit edilmiş ve sonra üç subletal dozda DEHP (LC değerinin 1/4; 1/8 ve 1/16 oranında) 24 ve 96 saat boyunca *G. pulex*'e uygulanmıştır. ELISA kiti kullanılarak Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (KAT), Sitokrom P450 (CYP1A1), Glutasyon S-transferaz (GST) aktiviteleri ölçülmüştür. *Gammarus pulex*'de meydana gelen apoptozisi belirlemek için immunohistokimyasal (IHC) analiz yöntemi olan Kaspaz (Caspase) metodu kullanıldı.

Farklı DEHP dozlarına maruz bırakılan gruplarda CYP1A1 aktivitelerinin azaldığı ancak bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. KAT aktivitesinin DEHP uygulamasına bağlı olarak 24 ve 96 saatler sonrasında genel bir artış gösterdiği gözlenmiştir. SOD ve GST aktivitelerinin ise 96.saat sonrasında arttığı saptanmıştır. Model canlının ışık mikroskobu incelemesinde ise; DEHP uygulamasının özellikle de *Gammarus pulex* solungaçlarında vakuolizasyon, anormal çekirdek pigmentasyonu, sütunların yokluğu, hemolenfatik kanallarda azalma veya yokluk ve hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna gözlenmiştir. 96. saat sonrasında ise solungaç kollapsı ve hiperplazi belirlenmiştir.

Sonuç olarak, SOD, KAT ve GST'deki değişikliklerin potansiyel olarak çevre içindeki risk değerlendirmesi için hassas biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği ve DEHP' in *Gammarus pulex*'de uygulama dozları ve uygulama sürelerindeki artışa bağlı olarak artan histopatolojik hasara ve pozitif immunoreaktiviteye neden olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan enzim, Detoksifikasyon Enzimi, *G. pulex*, Histopatoloji

ABSTRACT

Investigation of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate-Induced Toxicity Histopathologically and Biochemically in *Gammarus pulex*

Phthalates are chemicals that are added to reduce the hardness of plastic materials, to give materials flexibility and softness. Nowadays, many cosmetic products, detergent, toys and personal care products, such as products used in daily life is used for permanent odor and coloring. In this thesis, biochemical and histopathological changes in *Gammarus pulex* exposed to different doses of Di- (2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) are investigated and it is aimed to reveal the toxicity caused by DEHP.

For this purpose, the LC₅₀ (lethal concentration 50) value of DEHP was determined primarily using a static test. The DEHP LC value was found to be 0.079 ± 0.01 ppm, and then three sublethal doses of DEHP (1/4; 1/8 and 1/16 of the LC value) were administered to *G. Pulex* for 24 and 96 hours. Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (KAT), Cytochrome p450 (CYP1A1), Glutathione S-transferase (GST) activities were measured by using ELISA kit. Kaspaz method that is a immunohistochemical analysis method was used to determine apoptosis in *Gammarus pulex*.

CYP1A1 activities decreased in groups exposed to different DEHP doses but these changes were not statistically significant. It was observed that the CAT activity showed an overall increase after 24 and 96 hours after the application of DEHP. SOD and GST activities increased after 96 hours. In light microscope examination of the model organism; hemolymphatic filled hemolymph filled with hemolymphatic duct, hemolymphatic reduction or hemolymphatic ducts were observed especially in the *Gammarus pulex* gills. After 96 hours, gill collapse and hyperplasia were determined.

As a result, it is suggested that changes in SOD, CAT and GST can potentially be used as sensitive biomarkers for risk assessment in the environment and DEHP caused increased histopathological damage and positive immunoreactivity in *Gammarus pulex* depending on increased application doses and application times.

Key words: Antioxidant enzyme, Detoxification enzyme, *G. pulex*, Histopathology

TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmayı destekleyen Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim (YLMUB018-07).

Bu çalışmanın planlanması, hayata geçirilmesi, tezimin yazımı ve deneysel aşamamda her zaman yardımlarını gördüğüm danışmanlarım sayın Doç. Dr. Nuran CIKCIKOĞLU YILDIRIM ve Dr. Öğr. Üyesi Tuba PARLAK AK'a değerli katkısından dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen Çevre Mühendisliği Öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Şule TATAR ve Su Ürünleri Fakültesi sayın Arş. Grv. Dr. Osman SERDAR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

ÖMER ŞAMASAS

TUNCELİ-2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜRLER.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
GİRİŞ.....	1
1. Su Kirliliği.....	2
1.1. Endokrin Bozucular.....	2
1.1.1.Endokrin Bozucuların Çeşitleri.....	2
1.1.2. Sularda Endokrin Bozucu Maddeler ve Çevresel Etkileri.....	4
1.1.3. Çevresel Endokrin Bozucuların İnsanlar Üzerindeki Etkileri.....	5
1.1.4. Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri.....	6
1.1.5. Beslenme ve Endokrin Bozucular.....	7
1.1.6. Endokrin Bozucu Maddelerin Etkilerinden Korunmak İçin Alınabilecek Önlemler...8	
1.1.7. Fitalatlar.....	9
1.1.7.1. Fitalatların Yaptığı Toksik Etkiler.....	10
1.2. Biyoindikatörler.....	11
1.2.1. <i>Gammarus pulex</i>	12
1.2.1.1. <i>Gammarus pulex</i> Türünün Sistematikteki Yeri.....	13

1.3.Biyobelirteçler.....	14
1.4. Oksidatif Stres.....	14
1.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	15
1.4.2. Katalaz (KAT).....	16
1.4.3. Sitokrom P450 (CYP1A1).....	16
1.4.4. Glutasyon S-Transferaz (GST).....	17
1.5. Histopatoloji.....	18
1.6. Apoptozis.....	18
2. Materyal ve Metot.....	19
2.1. Model Canlının Doğadan Temini.....	19
2.2. <i>G. pulex</i> 'lerin Laboratuvar Koşullarına Adaptasyonu.....	19
2.3. Di-2-Etilhekzil Fitalat'ın LC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi.....	21
2.4. <i>G. pulex</i> ' in Di-2-Etilhekzil Fitalat (DEHP)'a Maruz Bırakılması.....	21
2.5. Diseksiyon İşlemleri ve Dokuların Hazırlanması.....	21
2.6. Biyokimyasal Yanıtın Belirlenmesi.....	21
2.6.1. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.6.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.6.3. Glutasyon S-Transferaz (GST) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.7. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler.....	23
2.8. İstatistiksel Analiz.....	24

3. BULGULAR.....	25
3.1. Biyokimyasal Bulgular	25
3.1.1 SOD Aktivitesi.....	26
3.1.2. KAT Aktivitesi.....	26
3.1.3. GST Aktivitesi.....	27
3.1.4. CYP1A1Düzeyleri.....	28
3.2. Işık Mikroskopik Bulgular.....	29
4. TARTIŞMA.....	35
5. SONUÇLAR.....	41
6. ÖNERİLER.....	42
7. KAYNAKÇA.....	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 3.1. Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan <i>Gammarus pulex</i> 'de SOD (u/ml) enzim aktivitesindeki değişimler	26
Şekil 3.2. Farklı Konsantrasyonlardaki di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan <i>G. pulex</i> 'de CAT (nmol/dk/ml) enzim aktivitesindeki değişimler	27
Şekil 3.3. Farklı Konsantrasyonlardaki di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan <i>G. pulex</i> 'de GST (nmol/dk/ml) enzim aktivitesindeki değişimler	28
Şekil 3.4. Farklı Konsantrasyonlardaki di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan <i>G. pulex</i> 'de CYP1A1(pg/ml) enzim aktivitesindeki değişimler	29
Şekil 3.5. Kontrol grubu <i>G. pulex</i> örneklerinin solungaçlarında 24 ve 96. saat sonrasında normal histolojik yapı ve negatif immunoreaktivite.	30
Şekil 3.6. A grubu <i>G. pulex</i> örneklerinin solungaçlarında 24 ve 96.saat sonrasında meydana gelen histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler.....	32
Şekil 3.7. B grubu <i>G. pulex</i> örneklerinin solungaçlarında 24 ve 96.saat sonrasında meydana gelen histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler.....	33
Şekil 3.8. C grubu <i>G. pulex</i> örneklerinin solungaçlarında 24 ve 96.saat sonrasında meydana gelen histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler.....	34

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1.1. Endokrin bozucu çeşitleri.....	4
Tablo 3.1. Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan <i>G. pulex</i> 'de bazı antioksidan ve detoksifikasyon enzim aktivitelerindeki değişimler.....	25



RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1.1. <i>Gammarus pulex</i>	13
Resim 2.1. <i>G.pulex</i> 'in toplanması	19
Resim 2.2. <i>G. pulex</i> 'lere uygulama yapılan akvaryumlar.....	20

.

KISALTMALAR

DEHP: Di-(2-Etilhekzil) Fitalat

LC₅₀: Letal Konsantrasyon 50

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SOD: Süperoksit Dismutaz

CAT: Katalaz

GST: Glutasyon-S-Transferaz

CYP1A1: Sitokrom P450

PBB: Polibromlu bifeniller

BPA: Bisfenol A

DDT: Diklorodifeniltrikloroetan

DES: Dietilstilbestrol

PCB: Poliklorlu bisfenoller

DINP: Diizononil fitalat

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

PBS: Fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi

ELISA: Enzyme Linked İmmuno Sorbent Assay

HRP: Horseradish peroksidaz

GİRİŞ

Canlıların sağılığını etkileyen, canlılara ciddi zararlar veren ve çevre üzerinde büyük zararlar meydana getiren, çevrenin yapısını ve işlevini bozan zararlı kimyasalların; hava, su, toprak ve bitkilere farklı yollarla karışması olayına çevre kirliliğı adı verilir (Yücel ve Morgil, 1998).

İlk insanın yeryüzünde ortaya çıkması ile birlikte çevre kavramı da ortaya çıkmıştır. Yani, çevre kavramı insanlık tarihi kadar eskidir. Çevre kirliliğinin çeşitleri genel olarak; hava kirliliğı, su kirliliğı, toprak kirliliğı, gürültü kirliliğı ve görüntü kirliliğı olarak sınıflandırılır(Sülün, 2002).

Çevre kirlilikleri doğaya çok tehlikeli zararlar vererek doğada yaşamını sürdüren bütün biyotik yapı (bitkiler, insanlar, hayvanlar) canlılarının zarar görmesine neden olmaktadır. Çevre kirlenmesi ile ekosistemin dengesinin bozularak iklimsel ve küresel bozulmaların meydana geldiğı bilinmektedir (Serin, 2010).

Çevreyi oluşturan etmenler canlı ve cansız öğeler olmak üzere ikiye ayrılır:

Canlı öğeler: bitkiler, hayvanlar, mikroorganizmalar ve insanlardır.

Cansız öğeler: iklim, hava, su, toprak vb. yapılardır.

Canlı ve cansız varlıklar sürekli birbirleriyle iletişim halindedir. Ekosistem içerisinde karşılıklı etkileşim içinde bulunan bütün canlıların hayatlarını devam ettirebilmeleri için gerekli şartlar mevcuttur. Burada “ekolojik denge” denilen bir kavram söz konusudur. Bu ekolojik denge, ekosistemde yaşayan insanların sanayileşme ve kentleşmesi sonucu bozulmuştur (Sülün, 2002).

Endokrin bozucuların 1940 yılından bu yana doğal yaşamdaki etkileri çalışılmasına rağmen, son on yılı aşkın bir süredir ismini oldukça fazla duyduğumuz bir çalışma alanı olarak karşımıza çıkmaktadır. Çok sayıda kimyasallar endokrin bozucu olarak tanımlanmakta ve insanlar bu kimyasallara meslekleri dolayısıyla, çevresel olarak (su, hava ve toprak yolu ile) ya da besin yolu ile maruz kalmaktadırlar. Endokrin bozucu kimyasallar, hem insanlarda hem de doğal yaşamda endokrin sistemin normal çalışmasını değıştiren bileşiklerdir.

1.1. Endokrin Bozucular

Gün geçtikçe miktar ve çeşit olarak artan kimyasallar ile dünyada bulaşıcı hastalık ve ölüm nedenlerinin başında gelen kronik hastalıklar arasındaki ilişki günümüz bilim adamları tarafından araştırma konusu haline gelmiştir.

Endüstriyel plastik ve atık maddeleri çevre ve insan sağlığı üzerine büyük riskler oluşturabilmekte ve ekolojik çevreye ciddi zararlar vermektedir. Böylelikle plastik içeren sentetik yapıdaki endokrin bozucuların varlığını mümkün kılması sebebiyle büyük riskler söz konusudur (Lintelmann ve ark., 2003).

Hayvanlar üzerinde yapılan bilimsel çalışmalarda bazı fitalat türlerinin endokrin bozucuların zararlı etkileri sonucu hücrelerde kalıtsal bozukluklara ve üreme toksisitesine neden olduğu ortaya konmuştur (Göktekin ve Barlas, 2008). Sanayi inkılabıyla dünyada oluşan kimyasalların omurgasızlar, sürüngenler ve balıklar dahil olmak üzere bütün türlerde üreme fonksiyonlarına zarar verdiği tespit edilmiştir. Bu kimyasallar endokrin sistemin yapısını etkileyerek organizmada olumsuz sağlık etkileri oluşturan ekzojen madde ve madde karışımlarıdır. Herhangi bir zararlı kimyasal maddenin endokrin bozucu olarak tanımlanabilmesi için sağlık üzerine ciddi olumsuz etkisinin olması gerekmektedir. Bu etkiyi endokrin sistem üzerinden gerçekleştirmesi öngörülmektedir (Göktekin ve Barlas, 2008).

Endokrin bozucuların etkileri; endokrin sistem ile kontrollü bir fizyolojik süreçte gözlemlenebilir ve endokrin bozucuların etkili olmadığı bir fizyolojik sürecin bulunmadığı düşünülmektedir. Endokrin bozucuların doğrudan etkili olmadıkları organ ve hücreleri de dolaylı olarak etkileyebildiği bilinmektedir (Yeşilkaya, 2008).

1.1.1. Endokrin Bozucuların Çeşitleri

Canlı vücudunun sağlıklı bir şekilde olması için önem taşıyan yapılar hormonlardır. Bu hormonların aktivitesini etkileyen çeşitli kimyasalların bulunduğu bilinmektedir. Bu bileşikler endokrin bozucu kimyasallar olarak adlandırılırlar (Alsopp, 1997).Avrupa Birliği Komisyonu 1995 yılında endokrin bozucu kimyasalları, sağlam bir organizmanın endokrin fonksiyonunda olumsuz değişiklikler meydana getiren kimyasal maddeler olarak tanımlamıştır (Bang ve ark., 2012).

Endokrin bozucular, sadece kimyasal yapılarıyla değil biyolojik etkileriyle de bilinen maddelerdir. Bu kimyasallar, bir popülasyonun veya popülasyon soylarının sağlığını ciddi şekilde etkileyebilir.

ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA)'na göre endokrin bozucu etkiye sahip bileşikler 3 grupta incelenir (McLachlan ve ark., 2006).

1. Sentetik olarak üretilen hormonlar: Doğum kontrol ilaçları ve bazı hayvansal gıda katkı maddeleri.
2. Doğal endokrin bozucular: Fitoöstrojenler (soya fasulyesi, elma, kiraz vb.). Bu gıdalar doğal hormon yapısında olduklarından düşük dozlarda kolayca parçalanır ve depolanmazlar (Lee, 2007).
3. Çevresel endokrin bozucular: Bu kimyasal maddeler genel olarak endüstri alanında kullanılmak üzere geliştirilmiş kimyasallar ve farklı çevresel kirleticilerdir (Bjorkblomve ark., 2011). Bunlar; biyosidler, insektisitler, herbisitler, nematositler, fungusitler, endüstriyel kimyasallar ve ağır metaller örnek verilebilir.

- Endüstriyel solventler veya yağlayıcılar olarak kullanılan sentetik kimyasallar ve bunların yan ürünleri (poliklorlu bifeniller)
- Polibromlu bifeniller (PBB'ler), dioksinler
- Plastikler (bisfenol A (BPA))
- Plastifiyanlar
- Pestisitler (diklorodifeniltrikloroetan (DDT))
- Mantar ilacı (vinclozolin)
- Farmasötik ajanlar (dietilstilbestrol (DES))

Endokrin bozucu kimyasallar kökenlerine göre de gruplandırılabilir (Calimanve Gavrilescu, 2009).

- Doğal ve yapay hormonlar (fitoöstrojenler, 3-omega)
- Yağ asitleri, doğum kontrol hapları ve tiroid ilaçları
- Hormonal yan etkileri olan ilaçlar (naproksen, metoprolol ve klofibrat).
- Endüstriyel kimyasallar (fitalatlar, deterjanlar, yangın geciktiriciler, plastikleştiriciler, çözücüler, 1,4-dikloro-benzen ve poliklorlu bisfenoller (PCB'ler))
- Endüstriyel ve evsel atıklar (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, dioksinler, pentaklorobenzen)
- Ticari kullanım amacı olmayan, diğer kimyasal maddelerin parçalanmaları ile ortaya çıkan çevresel kirleticiler yer almaktadır (Keith, 1998).

Tablo 1.1. Endokrin bozucu çeşitleri

Fitoöstrojenler doğal endokrin bozucular	komestan, daidzein, genistein, formononetin, biokanin-A, prunetin, pratensein, glisetein, ekuol, desmetilangolesin, enterolakton, enterodiol, matairesinol, zearalanon
Organohalojenler	Furanlar, Dioksinler Poliklorine bifeniller, Hekzaklorobenzen, Pentaklorofenol
Pestisitler	BBDH (2,4-diklorofenoksi asetik asit, 4- Klorometoksi asetik asit, Klormekuat), Alaklor, Aldikarb, Amitrol, Atrazin, Benomil, Karbaril, Klordan, diklorodifeniltriokloroetan ve metabolitleri, Endosulfan, Etilparation, Heptaklor, Kepon, Ketokonazol, Lindan, Malation, Trifluralin, Vinklozilin, Metoksiklor
Fitalatlar	Di-etilhekzil Fitalat, Di-Propil Fitalat, Dimetil Fitalat, Butil benzil Fitalat, Di-n-butil Fitalat, Di-n-fenil Fitalat, Di-heksil Fitalat, Dikloroheksil Fitalat, Dietil Fitalat
Ağır Metaller	Arsenik, Civa, Kadmiyum, Uranyum, Kurşun
İlaçlar	Doğum kontrol hapları, Simetidin, Dietilstilbestrol

1.1.2. Sularda Endokrin Bozucu Maddeler ve Çevresel Etkileri

Endokrin bozucu kimyasallar yüzeysel sularda ve yeraltı sularında tespit edilebilmektedir. Bunun yanı sıra geçiş sularının kıyı bölgelerinin de endokrin bozucu kimyasallar ile kirlendikleri bilinmektedir.

Endokrin bozucu maddeler atıksuların arıtıldığı atıksu arıtma tesisleri çıkış sularında bulunmaktadır. Çünkü bu kimyasal kirleticiler atıksu arıtma tesisinde giderilemez ve çıkış sularında tespit edilirler (Bjorkblomve ark., 2011).

Endokrin bozucu kimyasal maddeler atıksulara ve yeryüzü sularına insanlar tarafından kullanılan bazı ilaçlardan, deterjanlardan, evsel ve hayvansal atıklardan, tarımsal ilaçlardan karışmaktadır. Atıksuların akarsulara boşatılması sonucu içme suyu olarak kullanılması halinde endokrin bozucu maddeler ciddi sorunlar teşkil etmektedir (Kelce ve Wilson, 2001).

Endokrin bozucu maddeler, organik yapıları nedeniyle çevreye verildikten sonra ekolojik yaşam zincirinde ve hücresel yapılarda birikmektedir. Endokrin bozucular kararlı ve kalıcı bileşikler oldukları için, zamanla çeşitli faaliyetler sonucu çevrede dağılırlar.

Bu da çevre için çok ciddi sorunlar ortaya çıkarmaktadır. Sucul ortamlarda yaşayan canlılar endokrin bozucu kimyasallardan en çok etkilenen ekolojik ortamlardır. Sedimentlerde biriken endokrin bozucu maddeler bu ortamlarda yaşayan bentik organizmalara ve diğer su canlılarına ciddi zararlar vermektedir (Bistan ve ark., 2012). Bu endokrin bozucu maddeler üzerine bilim adamları tarafından araştırmalar yürütülmektedir. Endokrin sistemi bozucu kimyasallar son yıllarda gelişmiş ülkelerde ciddi sorunlar haline gelmiştir. Vücuda girdiğinde doğal hormonları etkisi altına alarak hücresel yapıları bozan endokrin bozucuların doğadaki birçok hayvan türlerinde (kuşlarda, balıklarda, memelilerde, sürüngenlerde vb.) kalıtsal bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca erkek organizmalarda dişilik gibi cinsiyet bozukluklarına sebep olduğu ileri sürülmüştür (Barthold ve ark., 1999).

1.1.3. Çevresel Endokrin Bozucuların İnsanlar Üzerindeki Etkileri

Son yıllarda, Avrupa'da bilim adamları ve araştırma kurumlarının üzerinde en çok çalıştıkları konulardan birisi endokrin sistemi bozucu olarak adlandırılan toksik ve kanserojen maddelerin çevreye verdiği zararların araştırılmasıdır. Endokrin sistemi bozucu etkiye sahip bu kimyasal maddeler, doğal hormonlara benzerlikleri nedeniyle canlıların normal fizyolojilerinde hormonal bozukluklara ve kalıtsal bozukluklara neden olmaktadır (Çetinkaya, 2009).

Endokrin bozucular hava ortamına doğrudan fabrikalardan, tehlikeli yakıt taşıyan araçlardan, endüstriyel kuruluşlardan, tarımsal ilaçlardan, deterjanlardan, sudan ve hava emisyonu ile geçmekte olup yağmur ile yeryüzüne düşmeden önce de atmosferde yüzbinlerce kilometre taşınabilmektedir (Allsop ve ark., 1997).

1.1.4. Endokrin Bozucuların Sağlık Üzerine Olumsuz Etkileri

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerine etkileri; kimyasal maddeye maruz kalma süresine, miktarına ve maruz kalma şekline göre değişmektedir (Çetinkaya, 2009).

Endokrin bozucu kimyasallar insan vücudunda en çok hücresel yapılara etki etmektedir ancak bunun yanı sıra birçok zararlı etkileri de bulunmaktadır. Üreme sistemi dışındaki etkileri ise, kanserojenik etkiye (insanlarda kanser hücresi çoğalmasına ve riskin artmasına) neden olmaktadır. Örneğin erkeklerde prostat kanseri gelişme riskinin artmasına da sebep olduğu bilinmektedir (Brown ve ark., 2004). Endokrin bozucuların etkileri yalnızca maruz kalan birey ya da nesilde değil daha sonraki nesillerde de gözlenebilir (El-Gohary ve ark., 1999). Yapılan bilimsel çalışmalarda kadınlarda herbisit ve fungisit gibi endokrin bozuculara maruziyet ile üreme sağlığı problemleri arasında ilişki olduğu kanıtlanmıştır. Erkek üreme sistemlerinde ise endokrin bozucuların etkilerinin kısırlığa ve testiküler germ hücreli tümörlere neden olabildiği gösterilmektedir. Yapılan bir çalışmada fitallara maruz kalma ile erkek üreme sağlığı bozuklukları arasındaki ilişki incelenmiş ve maruziyetteki artışının hastalık riskini de arttırdığı bulunmuştur (Vom Saal ve ark., 1998). Obezitenin temel nedeni yüksek enerji alımına karşı düşük fiziksel aktivite düzeyi olarak bilinmektedir. Oysa son yıllardaki obezite epidemisinin oluşumunda endokrin bozuculara maruziyetin de etkili olduğu görülmektedir (Allsop ve ark., 1997). Endokrin bozucuların metabolik etkileri ilk olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bilimsel bir çalışma ile diyabetli, kardiyovasküler hastalığı olan ve karaciğer fonksiyon bozukluğu olan bireylerin idrarlarında yüksek bisfenol A düzeylerinin belirlenmesi ile çalışılmaya başlanmıştır (Çetinkaya, 2009). Endokrin bozuculara maruziyetin gelişimsel programlamayı etkilediği bilinmesine rağmen, doğrudan metabolik sendrom ile ilişkisi aydınlatılamamıştır. Ancak endokrin bozuculara maruziyetin metabolik sendromun öncüsü olan diyabet ve obezite oluşumunda etkili olduğu bu nedenle metabolik sendrom oluşumunda da olası etkilerinin bulunduğu düşünülmektedir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda da BPA maruziyetinin adipoz dokudan adiponektin salınımını inhibe ederek metabolik sendrom oluşumuna yol açabileceği belirtilmiştir (Çetinkaya, 2009).

Endokrin bozucuların diğerk bazı olumsuz etkileri de iskelet anomalileri, çift cinsiyetlilik, feminizasyon, üreme gelişiminde zayıflama, kanda anormal hormon seviyeleri, bağışıklık sisteminin çökmesi, nörolojik problemler ve üreme dokularında kanser olarak sıralanabilir (Kabir ve ark., 2015).

1.1.5. Beslenme ve Endokrin Bozucular

Endokrin bozucu kimyasallar; besinler yolu ile insan vücuduna alınabilmektedir. Endokrin bozucular; yetiştirme esnasında ürüne geçebileceği gibi, depolama, taşıma ve işleme yöntemleri ile de besini kontamine edip ciddi sorunlar doğurabilir (Finkelman ve ark., 1999). Besinlerin endokrin bozucuların kaynağı olmasına en iyi örneklerden biri balık ve diğer deniz canlılarında belirlenen inorganik cıvadır (Booth ve Zeller, 2005). İnorganik cıva su kaynaklarına girerek daha sonra bu su kaynaklarını kullanan canlıların yağ ve benzeri dokularında birikmektedir. Bu balık ve deniz ürünlerinin insanlar tarafından tüketimi ile de besin zincirine katılarak, insanların yağ dokularında birikmektedir (Clarkson ve ark., 2003).

Beslenme durumu çevresel endokrin bozuculara maruz kalma düzeyini ve maruziyetin sonuçlarını etkileyebilir. Bireylerin lipid profili, oksidatif stres düzeyi ve antioksidan düzeyleri gibi birçok faktör beslenme durumundan etkilenir. Bu parametrelerin hücre düzeyindeki değişimleri biyolojik işlevleri olumsuz yönde etkiler. Sonuç olarak endokrin bozucular hastalık ve işlevsel bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (Kordas ve ark., 2007). Zararlı olmadığı düşünülen dozlardaki kurşun maruziyetinin beslenme durumu iyi olmayan çocuklarda zararlı etkilerin gözlenmesine sebep olduğu görülmüştür (Lanphear ve ark., 2005).

Endokrin bozucu maddeler besin öğeleri ve bu öğelerin metabolik ürünleri ile etkileşir. Arsenik maruziyeti ile beslenme arasındaki ilişki bu duruma örnek olabilir. Arsenik maruziyeti oksidatif stres yaratarak vücudun antioksidan mekanizmalarını inhibe eder. Antioksidan desteği arseniğe bağlı toksisiteyi azaltabilir (Brown ve Ross, 2002). Beslenme ve endokrin bozucular ile ilgili bu etkileşimin modellenmesinde yaş ve cinsiyet gibi birçok etmen de göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü bu etmenler hem bireyin beslenme durumunu hem de endokrin bozuculara maruziyeti ve endokrin bozucuların etkilerini değiştirerek her iki süreci de etkilerler.

Endokrin bozucuların insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere sebep olması nedeni ile çoğu ülkede bazı kimyasalların üretimi ve kullanılması yasaklanmaya başlanmıştır (Kim ve ark., 2002). Besin hazırlama ve saklamada kullanılan araç ve gereçler endokrin bozucu kimyasallar içerebilir. Bu zararlı malzemeler besine geçerek vcoda alınır. Besin saklamada kullanılan kapların besin ile etkileşime girmeyen cam malzemeden seçilmesine veya daha güvenli TSE standartlarına uygun kapların kullanılmasına dikkat edilmelidir. Tarım ilaçları çiftçiler tarafından bilinçsizce kullanılmakta ve doğaya ciddi zararlar vermektedir. Bu nedenle üretim tüketim zincirinin her bir aşamasında izlenebilirliğin sürdürülmesinden sorumlu olan Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan üretim izni alınan besin ve besinle temas eden ambalaj malzemeleri kullanmalıdır (Brown ve ark., 2004).

1.1.6. Endokrin Bozucu Maddelerin Etkilerinden Korunmak İçin Alınabilecek nlemler

Endokrin bozucu maddeler, insan sağlığı için bilinen en tehlikeli kimyasal zehirlerdir. Bu nedenle bağışıklık fonksiyonunda, hücrelere etki yaparak doğrudan veya diğer aracılarla dolaylı olarak hücreleri etkilerler (Dix ve ark., 1993).

Endokrin bozuların etkilerinden korunmak için;

- Bu kimyasal maddelere karşı ilkokul yıllarında verilecek eğitimle bilinç arttırılmalı.
- Habitatın (hava, toprak, su kaynakları, bitki örtüsü vs.) yaşam alanlarımızdan uzakta dahi olsalar başka canlıların doğal yaşam alanlarına (endüstriyel atıkların filtrelenmesi vs.) zen gösterilmeli.
- ocuk sahibi olmayı planlayan çiftlere eğitim verilmeli.
- Tüketim malzemeleri, ev ortamında kullanılan ürünler alınırken bilinçli davranılmalı.
- Sebze ve meyvelerin tarımsal ilaçlardan arınmış olmasına zen gösterilmeli ve gerekli durumlarda evdeki musluklarda filtre sistemi kullanılmalı.
- Gıda maddeleri ile temas halinde olan plastik ve benzeri petrokimyasallardan üretilmiş kaplar ve ambalajlar bilinçli seçilmeli.
- Cam şişedeki sular tercih edilmeli.
- Yapı malzemesi bilinmeyen bitkisel karışımlar sağlık profesyoneline danışılmadan tüketilmemeli.

- Bebek ve çocukların gelişimleri mutlaka hekimler tarafından izlenmeli. Erken veya geç ergenlik belirtisi gösteren, hızla kilo alan çocuklar hekim muayenesinden geçirilmeli.
- Kirli gölet ve su birikintilerine yüzme amacıyla girilmemeli.
- Kullanılmayan veya atılan deterjan, temizlik sıvıları, pestisitler ve ilaçlar (doğum kontrol hapları, hormon içeren ilaçlar) lavabo ve klozete dökülmemelidir.
- Sinek, sivrisinek ve böcek kovucu olarak doğal uçucu yağlar (lavanta, limon, nane gibi) tercih edilmeli.
- Çocukların oyunlardan sonra, tehlikeli maddelerle karşılaşmaları açısından ellerinin sabunlu suyla yıkanması.
- Plastik olan bazı kaplarda saklanan ürünlerin mikrodalga fırın yerine seramik veya cam kaplarda saklanması tercih edilmelidir (Fleisch ve ark., 2010).

1.1.7. Fitalatlar

Fitalatlar, PVC ve plastik malzemelerin sertliğini azaltmak, malzemelere esneklik ve yumuşaklık kazandırmak için katılan kimyasal maddelerdir. Plastik yumuşatma amacıyla kullanıldığı gibi günümüzde birçok kozmetik üründe, deterjan, oyuncak ve kişisel bakım ürünleri gibi günlük hayatta kullanılan ürünlerde de kalıcı koku ve renklendirme amacıyla kullanılmaktadır (Furhacker ve ark., 2005).

Endüstride esneklik kazandırmak için kullanılan fitalatların kullanımda olan 70'den fazla çeşidi bulunmaktadır. Yüksek moleküllü fitalatlar endüstrilerde % 85 oranında yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı fitalatlardan ise üreanlar, selülozikler ve akrilikler gibi vinil olmayan plastikleştirici olarak yararlanılmaktadır. Düşük moleküllü fitalatlar; deterjan, sabun, kağıt, karton, şampuan, otomotiv, inşaat ve yapı malzemeleri, torba, tüpler vb. endüstri üretiminde hammadde veya yardımcı kimyasal olarak kullanılmaktadır (Garewel ve ark., 1997).

Fitalatlar ve fitalat esterleri, fitalik asit esterleridir. Plastiklere eklendiklerinde bazı moleküllerin birbirlerine geçmesini sağlarlar. Suda çözünürlükleri düşük, uçuculuğu düşük, yağda çözünürlükleri yüksektir. Fitalik anhidrid ile uygun bir alkolün (genelde 6-15 karbonlu) reaksiyonu ile elde edilen bu esterler, renksiz ve oda sıcaklığında sıvı olan maddelerdir.

Fitalatlar, erkeklerde bazı hücrel bozukluklara sebebiyet verirler. Cinsel organlarda bazı gelişim bozukluklarına ve üreme hücrelerinde ciddi sorunlara neden olabilirler. Ayrıca fitalatlar hormonların dengesini bozduğu için birçok hastalıkta tetikleyici etki gösterebilir.

Fitalatların bebekler üzerinde çok ciddi tehlikeleri olması nedeniyle birçok fitalat türünün bebek ürünlerinde ve oyuncaklarında kullanılması yasaklanmıştır (Alleva ve ark., 1995).

1.1.7.1. Fitalatların Yaptığı Toksik Etkiler

Farklı fitalat esterlerinin toksisite potansiyeleri farklıdır. Tür farkları, temas yolu ve temas yaşı yönünden farklılıklar gözlenir ve toksisitenin ana maddenin toksik bir metabolite dönüşümüne bağımlı olduğu bildirilmektedir (Herbette ve ark., 2007).

Laboratuvar hayvanlarında fetal ölüm, malformasyon, karaciğer hasarı, antiandrojenik etki, testiküler hasar, peroksizom proliferasyonu ve üreme toksisitesine neden oldukları gösterilmiştir. Fitalat esterleri kemiricilerde kanserojen etki yapar (Fleisch ve ark., 2010). Örneğin; DEHP hepatokarsinojendir. Diizononil fitalat (DINP)' ın ise böbrek ve karaciğer kanseri yaptığı belirtilmektedir. Ancak bu risklerin insanlara ekstrapolasyonu temas düzeyleri ve koşulları yönünden yapılamadığı gibi, yeterli düzeyde ve kanıtlayıcı insan verileri bulunmamakta, uzman panellerin ve yönetsel kuruluşların değerlendirme ve yorumları sürekli endişe içermekle birlikte kesin bir yargıya varmamaktadır (Staples ve ark., 1998). Nitekim DEHP kemiricilerde hepatokarsinojen olmasına karşın Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC) tarafından “insanda karsinojen olarak sınıflanamayan” (KATEGORİ III) olarak değerlendirilmektedir. DEHP' ın karsinojenik etki mekanizması peroksizom proliferasyonu yapıcı etkisine ve insan karaciğerinde bulunmayan bir dizi hücrel olaya bağlanmakta, DINP' ın neden olduğu böbrek neoplazilerinin insanda bulunmayan mekanizmalar aracılığıyla geliştiği ileri sürülmektedir (Dodds ve ark., 1936).

“Gap junction” intrasellüler iletişiminin (GJIC) inhibisyonunun nongenotoksik karsinogenezin mekanizmalarından biri olduğu hipotezinden hareketle yapılan bir çalışmada, yüksek konsantrasyonda DEHP ve DINP' ın fare ve sıçanlarda GJIC inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (Dodds ve ark., 1936). Gözlenen inhibisyon ile karaciğer tümör indüksiyonu ve peroksizom proliferasyonu göstergeleri arasında bir bağlantı olduğu görülmüştür. Ancak primat ve insan karaciğer hücrelerinde bu inhibisyon gözlenmemiştir.

Bu bulguların, DEHP ve DINP' ın kemiricilerdeki karsinogenik etkisinin insanlar için geçerli olmadığı görüşünü desteklediği bildirilmektedir (Staples ve ark., 1998).

Fitalatların deney hayvanlarında gelişimsel toksisite gösterdiği ve teratojen etkili olduğu bilinmektedir. Son yıllarda bu konuda insanlarda da, özellikle erkek üreme gelişimini etkileyen geniş toksikantlar olduğu gözlenmiştir (Gerhardt., 2009).

Di-(2-etilhekzil) fitalat, su ekosistemlerinde nispeten uzun süre kalabilmekte ve sudaki organizmalar için risk oluşturabilmektedir. DEHP, bir gelişim ve üreme toksikantı olarak birçok akuatik toksikolojik çalışmada yaygın bir şekilde tanımlanmaktadır. DEHP' ın dışı Japon medekaların (*Oryzias latipes*) oosit gelişimini geciktirdiği tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2002). Son zamanlarda, DEHP' ın dışı zebra balıklarında oogeneze ve embriyo üretimini önemli ölçüde bozduğu da gösterilmiştir (Carnevali ve ark., 2010). Ayrıca DEHP' ın erkek Zebra balıklarında (*Danio rerio*) spermatogenezi bozduğu ve bunun sonucu olarak da oositleri dölleme kabiliyetinde bir azalmanın olduğu ifade edilmiştir (Uren-Webster ve ark., 2010).

1.1.Biyoindikatörler

Ekolojik ortamlarda bazı türlerin baskın olarak bulunduğu gözlenmiştir. Bazı türlerin ise baskın tür olmamasına rağmen belli çevre koşullarda ya da tür topluluklarının göstergesi olarak kullanılabildiği görülmüştür. Bu türler biyolojik anlamda indikatör tür olarak bilinirler. Bazı bilimsel araştırmalar biyoindikatör türleri 'doğal dengenin bozulduğunu gösteren ve belli koşullarda gelişebilen türler' olarak tarif ederken bazıları da belli çevre etkilerine karşı duyarlı olan bitki ve hayvan türleri olarak tanımlamaktadır (Tejeda-Vera ve ark., 2007).

Doğal su ekolojisine çeşitli yollarla giren kimyasal kirleticiler arasında en önemlileri ötrofikasyona yol açan gıda elementleri ile birleşerek kalıcı toksik ve kanserojen etki oluşturan kimyasal maddelerdir. Kirleticilerin doğal su ekosistemlerindeki davranışlarının incelenmesi amacıyla çeşitli bilimsel ölçümler yapılmakta ve ortamdaki hareketleri, organizmalar ile ilişkileri incelenmektedir (Adams, 2002). Artan çevresel kirleticiler su kaynaklarındaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik yapıyı değiştirmektedir. Bu değişimler su kaynaklarında yaşayan canlı organizmaları da etkilemektedir. Yapılan bilimsel araştırmalar bu değişimin düzeyini belirlemek için kimyasal araştırmaların yanısıra biyolojik araştırmaların da yapılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır (BriggsReed ve Heagler, 1997).

Biyolojik araştırmalar kimyasal yöntemler ile tespit edilmeyen bazı verilerin elde edilmesi bakımından büyük önem sağlamaktadır. Biyoindikatör ve biyobelirteç kavramları bu incelemelerin kaynağını oluşturmaktadır. Biyoindikatörler sucul ortamlarda yaşayan bazı spesifik tür veya tür gruplarını içerirken, biyobelirteçler bu canlılara ait biyokimyasal, fizyolojik ve histolojik parametreleri içermektedir. Su ortamındaki ekosistemlerde meydana gelen değişikliklerin izlenmesi için oluşturulan biyoizleme gruplarında biyoindikatör türler ve biyobelirteç parametreler dahil edilmelidir (BriggsReed ve Heagler, 1997).

1.2.1. *Gammarus pulex*

Amphipoda türü içinde yaşayan, Gammaridae familyası en ilkel üyeleri de içine alan büyük bir grubu temsil etmektedir. Bu grup dünya genelinde 200’den fazla cins ve 1340’dan fazla türe sahiptir. Bu türler genellikle tatlı sularda yaşamsal faaliyetler göstermektedirler (Leroy ve ark., 2010).

Gammarus cinsine ait olan türler yüzey sularında yaşarken, birkaç türünün mağaralar, kuyular ve diğer yeraltı habitatlarında bulunduğu gözlenmiştir. Amphipoda’ya ait cinslerin, *Gammarus* cinsi yüzey sularında yaşayan en fazla sayıya sahip cins olduğu bilinmektedir. Araştırmalar sonucunda *Gammarus* cinsinin Avrupa ve Türkiye’nin tatlı sularında oldukça yüksek bir tür çeşitliliğine sahip olduğu gözlenmiştir (Karaman ve Pinkster, 1977).

Gammarus pulex türleri suların verimli bölgelerinde ve predatörlerinden saklanabilecekleri bitkiler arasında, kayaların altında, çakıl, kum ve ölü organizmaların arasında yaşarlar. Çoğunlukla parçalanmış hayvansal ve bitkisel atıklar ile beslenirler. Sudaki etçil canlıların, balık, su kuşları ve diğer su canlılarının besin kaynağıdır (Barnard ve Barnard, 1983).

Su kalitesinin analizinde yapılan çalışmalarda Gammaridae’ler biyoindikatör organizmalar olarak kullanılırlar. Özellikle kimyasal madde atıkları ve metal kaynaklı su kirliliği üzerine yapılan çalışmalarda Gammaridae familyasına ait türlerden yararlanılır (Tatlı ve ark., 2018). Bu konuda yapılmış bir bilimsel çalışmada, Manchester’ da kireç madenlerinin bulunduğu bir bölgedeki küçük bir akarsu sedimentinde biriken ağır metalleri belirlemek için *Gammarus* türlerinin dokularındaki ağır metal birikimi araştırılmıştır (Gazea ve ark., 1999). Bakır, çinko ve kurşun gibi tehlikeli maddelerin sıcaklıkla olan ilişkisini inceledikleri bilimsel çalışmalarında *Gammarus pulex*’i deney hayvanı olarak kullanmıştır (Bat ve ark., 2000).

1.2.1.1. *Gammarus pulex* türünün sistematikteki yeri

Alem: Animalia

Şube : Arthropo

Altşube : Crustacea

Sınıf : Malacostraca

Takım : Amphipoda

Aile : Gammaridae

Cins : Gammarus

Tür : *Gammarus pulex*



Resim 1.1. *Gammarus pulex*

Su kalitesi analiz çalışmalarında Gammaridlerin etkin bir şekilde kullanıldığı yapılan literatür araştırmalarında kanıtlanmıştır (İssartel ve ark., 2010). Yapılan laboratuvar çalışmalarında kabuklulardan olan gammaridlerin su kalitesinin ölçümü için önemli araçlar olduğu öne sürülmüştür (Maltby ve Crane., 1994). Yapılan bir çalışmada *G. pulex*' in metalik atıklara karşı tepkileri araştırılmıştır. Metalik atıkların atık su kalitesine etkisini değerlendirmek için *G. pulex*'in duyarlı bir indikatör tür olduğu kanıtlanmıştır (Mayes,1991).

1.2. Biyobelirteçler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) biyobelirteç terimini, canlı organizmalarda ortaya çıkan hastalıkların zararlarının ve sonuçlarının tahmini için vücutta ölçülebilir olan bütün madde, yapı veya süreçler olarak tanımlamaktadır. Biyobelirteçler, belirli çevresel kirleticilerin neden oldukları, fizyolojik, biyokimyasal, immünolojik ve histopatolojik etkiler gibi toksik etkileşimlerin göstergesidirler (Sanchez-Hernandez, 2007).

Biyobelirteçler kan, vücut sıvıları veya dokularda bulunan, normal veya anormal bir durumun göstergesi olan biyolojik moleküllerdir (Nam ve ark., 2010).

Biyobelirteç terimi, ilk zamanlarda tıp alanlarında kullanılmıştır. Sucul ortamlarda ise oluşan kirliliğin belirlenmesinde tercih edilmiştir. Çoğunlukla omurgasız ve çift kabuklu yumuşakça türü canlılardan sağlanan parametreler için de kullanılmıştır (Poste, 2011).

Biyobelirteçler biyolojik analiz yöntemleri olarak da tanımlanabilirler, ekosistemlerde yaşayan canlı organizmalarda kirlenmenin etkilerini iyi yansıtabilirler (Maggioni ve ark., 2012).

1.4. Oksidatif Stres

Biyokimyasal parametreler sucul organizmaların sağlık durumlarının bir göstergesi olarak sıkça kullanılmaktadır. Bu bakımdan herhangi bir stresin göstergesi olarak biyokimyasal metotların kullanımı, bu değişen çevreye karşı canlıların fizyolojik tepkileri hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Revathv ve ark., 2015).

Aerobik organizmalarda normal fizyolojik ve metabolik süreçler sonucunda üretilen reaktif oksijen türleri toksiktir ve birçok biyomolekülü oksitleyerek hücre ölümüne ve doku hasarlarına yol açarlar. Bu reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli oluşturulur ve normal şartlar altında enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılmaktadırlar (Yamamoto ve ark., 2002).

Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki denge, aerobik organizmaların fonksiyonu ve yaşamı için önemlidir. Prooksidanlar lehine ve antioksidanlar aleyhine bir dengesizlik, canlı vücudunda ciddi hasara yol açabilir ve bu oksidatif stres olarak adlandırılır (Meotti ve ark., 2004).

Bir başka bir ifadeyle oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkilerin toplamı oksidatif stres olarak adlandırılır.

Serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılmasında bir azalma olduğu zaman ya da aşırı üretilmeleri durumunda patolojik bir durum oluşabilir (Menster ve ark.,1983).

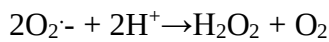
1.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

(SOD), oksijen ve hidrojen peroksit içine süperoksit anyonun parçalanmasını katalize eden bir enzimdir. Bu enzimler, hücrelerde aerobik ortamlarda ve hücre dışı sıvılarda bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz 1960'lı yıllarda oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.

Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (Fridovich, 1983).

Antioksidan etkisi ilk defa 1969 yılında keşfedilmiştir (Mccord ve Fridovich, 1969). SOD enzimi, aktif merkezinde bulunan metale göre bakır-çinko (CuZnSOD), mangan (MnSOD) ve demir (FeSOD) olmak üzere üç çeşittir. SOD aktivitesi omurgasızlarda büyük ölçüde değişkenlik gösterir, fakat omurgalılara göre aktivitesi genellikle daha düşüktür. Omurgasız CuZn-SOD formu memelilerdekine benzer özellik gösterir. Amfibilerdeki SOD beyinde en yüksek aktivite ve akciğerde en düşük aktiviteyi gösterirken yüksek omurgalılarda karaciğerde aktivite genellikle en yüksektir (Ahmad, 1995).

O_2^- anyonunun H_2O_2 'ye dismutasyonunu gerçekleştiren enzimdir (Valko ve ark., 2004).



Bu tepkime oksidatif strese karşı savunmayı başlatır (Gilbert ve ark., 2002). Sonuçta oluşan ürünler ya lizozomlardaki CAT tarafından ya da mitokondrideki glutatyon peroksidaz tarafından H_2O 'ye detoksifiye edilir (Johansen ve ark., 2005).

1.4.2. Katalaz (KAT)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu ve hidroksil radikali, oksijen (O_2) molekülünün redüksiyonu ile ortaya çıkan biyolojik etmenlerdir. Varolan bu radikaller oldukça reaktif ve canlı organizmalar için toksiktir (Duthie ve ark., 1989).

SOD ve KAT gibi antioksidan enzimler canlıyı bu zararlı maddelelere karşı korurlar. Serbest radikaller çeşitli hücrelere ait pek çok hastalığın patofizyolojisinde suçlanmakta ve bu hastalıkların tedavilerinde serbest radikal oluşumunu önleyen ilaçlar ve antioksidanlar kullanılmaktadır (Duthie ve ark., 1989).

KAT, yaklaşık 240 kDa molekül ağırlığında olup, aktif kısmında dört tane Fe^{+3} bulunduran proteindir. Her alt ünite enzimi kendi substratı suya karşı koruyarak ve etkinliğini arttırarak NADPH içerir (Young ve Woodside, 2001).

KAT, SOD'a benzer bir dismutasyon mekanizması ile hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri suyun zararlarına karşı korur (Duthie ve ark., 1989).

1.4.3. Sitokrom P450 (CYP1A1)

Vücuda giren bütün yabancı kimyasal maddeler Faz I ve Faz II enzimleri ile metabolitlerine çevirilerek vücuttan atılır. Vücuda alınan ve çoğu hidrofobik yapıdaki ksenobiyotikler karaciğerde önce Faz I enzimleri tarafından katalizlenen redüksiyon, oksidasyon ve hidroliz reaksiyonları sonucunda suda çözünür metabolitlere dönüştürülürler (Kaklıkkaya ve ark., 2010).

Faz I reaksiyonları, substratın doğasına göre bazen aktivasyon bazen de deaktivasyonla sonuçlanır. Bu metabolitlerin çoğu bundan sonra, Faz II enzimleri olarak adlandırılan konjugasyon enzimleri tarafından daha da hidrofilik yapıda olan sülfat, glukuronik asit gibi konjugatlarına çevrilirler. Faz II reaksiyonları çoğunlukla deaktivasyonla sonlanır ve oluşan metabolit vücuttan atılır (Buhler ve Williams, 1989).

Sitokrom P450 enzimleri ise, farklı ve çok çeşitli substrat özgüllüklerine sahip bir enzim süper ailesidir. Bu enzimler; çevresel kirleticiler, kimyasal maddeler, ilaçlar, antioksidanlar, organik çözücüler ve boyalar gibi ekzojen bileşiklerin metabolizmasında rol almalarının yanı sıra, steroid hormonlar, yağ asitleri, kolesterol, safra asidi, prostoglandinler, biyojenik aminler, retinoidler gibi endojen kaynaklı bileşiklerin de oksidatif, redüktatif ve

peroksidatif metabolizmasından da sorumludurlar (Gonzalez, 1989; Guengerich, 1992; Waterman, 1996).

Organizmada endojen ve ekzojen kaynaklı bileşiklerin metabolizmasında ve çeşitli fizyolojik işlevlerinde çok önemli role sahip sitokrom P450 enzimleri arkealardan funguslara, mayalara; bitkilerden hayvanlara kadar yaşamın tüm formlarında bulunmaktadır (Wright ve ark., 1996;).

Bazı sitokrom P450'lerin seviyeleri ve aktiviteleri çeşitli kimyasallara maruz kalma neticesinde de artma veya azalma gösterebilir (Conney ve ark., 1956).

Sitokrom P450'lerin substratı olan pek çok endojen ve ekzojen maddenin aynı zamanda enzimin yarışmalı, yarışmasız ve geri dönüşümsüz inhibitörü, indükleyicisi veya baskılayıcısı oldukları durumlar da söz konusudur (Coleman, 2005; Estabrook, 2003).

1.4.4. Glutasyon S-Transferaz (GST)

Ksenobiyotik metabolizmasında önemli role sahip bir diğer enzim ailesi GST'lar ilaçların ve ksenobiyotiklerin büyük bir kısmının Faz II metabolizmasından sorumludur. Bu enzimler, çeşitli ekzojen veya endojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofobik bileşiklerin, glutasyon (GSH) ile konjugasyonunu sağlayarak vücuttan atılımlarını gerçekleştirir (Allsopp ve ark., 1997). GST'lar, elektrofilik substratların, GSH'a nükleofilik ataklarını katalize eder dolayısıyla, bu substratların hücre içerisindeki makromoleküllere karşı reaktivitelerini azaltırlar (Allsopp ve ark., 1997). Bu enzimler, ksenobiyotikleri GSH'daki sistemine ait -SH grubu ile bağlayarak onların elektrofilik bölgelerini nötralize eder. Bu sayede oluşan GSH konjugatlarıyla bileşiğin daha fazla suda çözünür hale gelmesi sağlanır. Bu aşamanın ardından GSH'dan koparılan glutamat ve glisin, serbest amino grubu ile asetillenip, merkapturik asitlere dönüştürülür ve safra yolu ile vücuttan atılır. Bu şekilde, pek çok potansiyel kanserojen, sitotoksik ve genotoksik bileşiğin GSH ile konjugasyonu sonucu vücuttan atılımlarını sağlayan bu enzim ailesi, vücut için oldukça önem taşıyan enzim gruplarından biridir (Cobanoğlu ve ark., 2011).

1.5. Histopatoloji

Histopatoloji, temelde bir organizmanın hastalıklı veya deneysel olarak değiştirilmiş hücre ve dokularının sağlıklı veya kontrol muadilleri ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilen bir mikroskopik inceleme yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu inceleme yöntemi sayesinde histolojik anormalliklerin yarı kantitatif olarak belirlenmesi amaçlanmaktadır. İnsan veya hayvan histolojisi çalışmalarına dayanan histopatolojik değerlendirme yöntemi aynı zamanda mikroskopik anatomi olarak adlandırılmakta ve tıbbi araştırmalar için önemli bir araç olarak görev yapmaktadır. Işık mikroskobu kapsamı altında ince bir örnek kesitinin incelenmesiyle gerçekleştirilen histoteknik, doku ve hücrelerin mikroskopik özelliklerinin görselleştirilmesine izin veren ve hastalıkların spesifik mikroskopik yapısal değişikliklerini tanımlayan bir dizi prosedürden oluşmaktadır (Staples ve ark., 1998).

Histolojik çalışma, toksik maddelere maruz kalma nedeniyle organların yapısal organizasyonunda meydana gelen değişikliklerin derecesini anlamak için dikkate değer ve ilgili bir parametredir. Kirletici maddelere maruz kalmanın bir göstergesi olarak histoloji; özellikle subletal ve kronik etkiler için, kirliliğin derecesini değerlendirmede yararlı bir yol sunmaktadır (Bernet ve ark., 1999).

1.6. Apoptozis

Apoptozis, bir hücrenin programlı ölümüne yol açan ve canlılarda normal fizyolojik durumlar için gerekli olan bir süreçtir (Sinha Hikim ve Swerdloff, 1999). Fakat bazı sentetik endokrin bozucuların organlarda apoptotik etki yaptığı gösterilmiştir. Normal şartlarda antioksidan enzimler, organizmada oluşan reaktif oksijen radikallerini (ROS) zararsız hale getirmektedir. Ancak, endokrin bozucuların çok değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda ROS' nin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünülmektedir. Oksidatif stres sonucu açığa çıkan ROS' nin mitokondri, plazma membranı ve genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak apoptozis başlatılabilmektedir (Ulukaya, 2003).

Hayvanlarda nongenotoksik epigenetik bir karsinojen olduğu bilinen DEHP' ın geri dönüşümlü olarak intersellüler gap junctional iletişimi inhibe ettiği ve bu sebeple hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozisi üzerinde etkisi olduğu belirtilmektedir (Takeuchi ve ark., 2003).

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Model Canlının Doğadan Temini

Çalışmada kullanılan model canlı *G. pulex* örnekleri, Tunceli İli Munzur Akarsuyu yan kollarından (39.156820 N, 39.499640 E) temin edilmiştir (**Resim 2.1**).

G. pulex'ler Eylül 2018 – Ekim 2018 döneminde, örnekleme noktasının akıntılı kısımlarından dip kepçesi yardımıyla, durgun kısımlarından hortumla vakumlanmak suretiyle toplanarak, hava takviye edilmiş tanklarla Munzur Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü Akuatik Toksikoloji Araştırma Laboratuvarına canlı olarak getirilmiştir.



Resim 2.1. *G.pulex*'in toplanması

2.2. *G. pulex*' lerin Laboratuvar Koşullarına Adaptasyonu

Laboratuvara canlı olarak getirilen *G. pulex* örnekleri doğal ortamına benzer şekilde hazırlanmış akvaryumlara yerleştirilmiştir. Bu amaçla canlı materyalin yaşam ortamından

getirilen sedimentler distile su ile yıkanarak 80x40x25 cm ebatlarındaki stok akvaryumlarına ilave edilmiştir (**Resim 2.2**).

Akvaryumlara örneklerin temin edildiği doğal ortamlardan alınan dinlenmiş su konulmuştur. Laboratuvar aydınlatmasında, (12 saat aydınlık, 12 saat karanlık) şekilde fotoperiyot uygulanmıştır (Wetherill ve ark., 2007).

Ortam sıcaklığı termostatlı klima sayesinde hem adaptasyon hem de test aşamalarında 10, 14 ve 18°C'ye ayarlanarak sabit tutulmuştur. *G. pulex*'lerin doğal ortamlarından toplanan salkım söğüt ve çayır söğüdü ağaç yaprakları cam bir kaptı, suyun içinde çürütölerek *G. pulex*'lerin beslenmesinde kullanılmıştır (Cernevali ve ark., 2010).

Stok akvaryumlarında su sirkülasyonu için harici filtre, *G. pulex*'lerin oksijen ihtiyacını karşılamak için hava motoru kullanılmıştır. Akvaryumlardaki suların %70'i canlıların doğal ortamından temin edilen dinlenmiş suyla haftada bir değiştirilerek yenilenmiştir. Adaptasyon süresince canlıların beslenmesi ve hareketliliği gözlemlenmiştir.



Resim 2.2 *Gammarus pulex*'lere uygulama yapılan akvaryumlar.

2.3. Di-2-Etilhekzil Fitalat'ın LC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

96 saat maruziyet sonrasındaki Di-2-etilhekzil fitalat (DEHP)'ın LC₅₀ değeri belirlenmiştir. Bu amaçla öncelikle aralık belirleme çalışması yapılmış, sonrasında statik test uygulanmıştır (APHA, 1998).

2.4. *G. pulex*' in Di-2-Etilhekzil Fitalat (DEHP)'a Maruz Bırakılması

Çalışmada kullanılan DEHP Sigma-Aldrich firmasından ticari olarak satın alınmıştır. DEHP'in LC₅₀ değeri 0,079±0,01 ppm olarak tespit edildi ve sonra üç subletal dozda DEHP (LC₅₀ değerinin 1/4; 1/8 ve 1/16 oranında) 24 ve 96 saat boyunca *G. pulex*'e uygulandı. *G. pulex* (her grup için n: 10), 24 saat ve 96 saat boyunca DEHP içeren sentetik solüsyonlara maruz bırakılmıştır. Dört deney grubu aşağıdaki şekilde tasarlanmıştır: A (0,02 mg/L DEHP içeren grup); B (0,01 mg/L DEHP ihtiva eden grup); C (0,005 ppm DEHP içeren grup) ve kontrol grubu.

2.5. Diseksiyon İşlemleri ve Dokuların Hazırlanması

Bu kısımda yapılacak tüm çalışmalar Munzur Üniversitesi Merkezi ARGE Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda model canlı olarak *Gammarus pulex* kullanılmıştır. Dokular tartılmış ve 1/5 w / v oranında PBS tamponu (fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi) eklenerek, buz ile birlikte homojenizatör kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen bu örnekler soğutmalı santrifüjde 17000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek ve elde edilen süpernatantlar -86°C'de derin dondurucuda ölçüm işlemleri tamamlanıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

2.6. Biyokimyasal Yanıtın Belirlenmesi

Çalışmamızda biyokimyasal yanıtın belirlenmesi için, SOD, KAT, CYP1A1, GST aktiviteleri seviyeleri belirlendi.

SOD, KAT, GST enzim aktiviteleri Cayman ticari firmasından satın alınan (katalog no KAT: 707002, SOD: 706002, GST: 703302) ELISA kitleri kullanılarak mikropılaka okuyucuda belirlenmiştir.

CYP1A1 kiti ise CUSABIO firmasından satın alınmıştır. (katalog no: CSB-EL006395FI).

2.6.1 Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kit içeriğinin belirlediği bu yöntem hipoksantin ve ksantin oksidaz tarafından üretilen süperoksit radikallerinin belirlenmesi için tetrazolium tuzu kullanılır. Bir ünite SOD % 50'sinin dismutasyonunu gösteren enzim miktarı olarak tanımlamaktadır. Bu yöntem üç tip SOD'un aktivitesini de belirlemektedir.

2.6.2. Katalaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kullandığımız kit enzim aktivitesinin belirlenmesi için KAT'ın (peroksidatik) fonksiyonunu kullanılmıştır. Yöntem enzimin optimal bir su (H_2O_2) konsantrasyonunun varlığında metanol ile reaksiyona girmesine dayanır. Üretilen formaldehit, 5-amino-4-hidrazino-6-merkapt-2,3,4-triazol (Purpald) ile kromojen olarak spektrofotometrik olarak ölçülür. 1,2 Purpald, özellikle aldehitlerle bisiklik bir heterosikl oluşturur; oksidasyon değişimine bağlı olarak renksizden mor renge doğru bir değişim gözlenir.

2.6.3. Glutasyon S-Transferaz Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon S-Transferaz enzim aktivitesi (Cayman Chemical Company) The Cayman Glutathione S-Transferase Assay Kit (Catalog No: 703302) ile 340 nm'de mikropilaka okuyucuda ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda kit içeriğinde bulunan protokole göre standart grafik çizilmiştir. Enzim aktivitesi standart grafik kullanılarak nmol/dk/ml olarak hesaplanmıştır. Yöntemin esası, Cayman Glutathione S-Transferase Assay Kiti redükte glutasyon ile 1-chloro-2,4-dinitrobenzenin (CDNB) konjugasyonunun ölçümü yoluyla toplam GST aktivitesini ölçmektedir. Konjugasyon 340 nm'de bir artışa neden olur. Bu artış örnekteki GST aktivitesinin oransal artışı anlamına gelir.

2.7. Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirmeler

Çalışmamızda, 24 saat ve 96 saat boyunca üç farklı oranda DEHP içeren sentetik solüsyona maruz bırakılan *G. pulex* model canlılarında meydana gelen histopatolojik ve immunohistokimyasal değişikliklerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bahsi geçen değerlendirmeler için *G. pulex* model canlıları bulundukları solüsyonlardan alınarak hızlıca Bouin (her grup için n: 5) ve % 10 Tamponlanmış Nötral Formalin (her grup için n: 5) doku tespit solüsyonlarına bırakıldı. Bouin solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edilen model canlılar % 50, 70, 80, 96 I, 96 II, 100 I ve 100 II'lik alkol serilerinden geçirildi. % 10 Tamponlanmış Nötral Formalin solüsyonunda 24-30 saat süreyle tespit edilen canlılar daha sonra 12-24 saat kadar akarsuda yıkamaya bırakıldı. Yıkamayı takiben model canlılar % 70, 80, 96 I, 96 II, 100 I ve 100 II'lik alkol serilerinden geçirildi. Her iki tespit solüsyonundaki *G. pulex* model canlıları alkol serilerini takiben ksilol I, ksilol II ve ksilol III serilerinden de geçirilerek 45°C'lik etüvde ksilol-parafin karışımında 1 gece bekletildi. Bunu takiben üç ayrı parafin serisinde birer saat süreyle bekletilerek parafin bloklar hazırlandı. Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotomda 5 µm kalınlığında immunohistokimyasal değerlendirme için poli-L-lizin kaplı ve histopatolojik değerlendirme için rodajlı lamlara seri kesitler alındı. Bu kesitlere 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapıldı. Kesitler, histopatolojik incelemeler için rutin Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama yöntemine göre boyandı.

Gammarus pulex model canlılarında meydana gelen apoptozisi (programlı hücre ölümü) belirlemek için immunohistokimyasal (IHC) analiz yöntemi olan Kaspaz (Caspase) metodu kullanıldı. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü üretici firma talimatlarına ve önceki çalışmalarımızda uyguladığımız protokole uyularak gerçekleştirildi (Tatlı Seven ve ark., 2018a; 2018b). Boyama işlemine başlamadan önce, kesitler 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi. Etüvden çıkarılıp soğutulan kesitlere 3 kez, 10'ar dakika ksilol solüsyonlarında deparafinizasyon işlemi uygulandı. Daha sonra % 100, 96 ve 80'lik alkol serilerinde ise 10'ar dakika rehidratasyon işlemi yapıldı. Kesitler önce distile suda çalkalandı ve arkasından antijen retrieval prosedürünü uygulamak üzere sitrat buffer solüsyonuna (pH 6.0) alındı. Mikrodalgada yaklaşık 20 dakika kaynatıldıktan sonra çıkarılan kesitler oda ısısında soğutulduktan sonra 3 kez, 5'er dakika Phosphate Buffered Saline (PBS) solüsyonunda yıkandı. Kesitler kurularak dokuların etrafı immun kalemle çizildikten sonra endojenperoksidaz aktivitesini engellemek için % 3'lük H₂O₂'de (200 ml methanole 6 ml

H₂O₂ eklenerek) 5 dakika bekletilerek akabinde 3 kez, 5'er dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Ardından kesitler Ultra V (UV) blok ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra direkt primer antikor uygulamasına geçildi. Kesitler, primer antikor olarak Rabbit Polyclonal Active Caspase-3 Antibody (Thermo Scientific, CPP32, Ab-4, UK) ile 37 °C'lik etüvde 1 saat süreyle nemli ve karanlık ortamda (humidifiedchamber) inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonundan sonra PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitlere akabinde Biotinylated Goat Anti-Polyvalent ile 30 dakika oda sıcaklığında sekonder antikor inkübasyonu yapıldı. Ardından PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitler Streptavidin HRP (Horseradish peroksidaz) ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS solüsyonunda 3 kez, 5'er dakika yıkanan kesitler kurularak 3-Amino-9-etilcarbazole (AEC) kromojen (ThermoScientific, Ultra Vision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/AEC, UK) ile 5-20 dakika muamele edildi. Sonrasında kesitler 5 dakika distile suda yıkandı ve zemin boyaması için zıt boya olarak Mayer's hematoksilende 30 saniye boyama yapıldı. Son olarak akarsuda 5 dakika yıkanan kesitler aqueousmountingmedium ile kapatıldı.

Gammarus pulex model canlılarına ait kesitlerdeki histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmeler fotomikroskop özelliğine sahip ışık mikroskopunda (Olympus BX- 51, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, JAPAN) incelenerek yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Kesitlerdeki pozitif immunoreaktivite boyanma yoğunluğuna bakılarak (-; boyanma yok, +; zayıf, ++; orta, +++; şiddetli) derecelendirildi.

2.8. İstatistiksel Analiz

Aynı uygulama peryodunda uygulama dozları arası istatistiksel fark Duncan's çoklu karşılaştırma testine göre belirlenmiştir. Aynı uygulam grubunda uygulama süreleri arasındaki fark Bağımsız T testi ile belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Bu çalışmada DEHP'in *Gammarus pulex*'de oluşturduğu toksisite biyokimyasal olarak incelenmiş olup *G.pulex*'de SOD, KAT, CYP1A1, Glutasyon GST aktiviteleri belirlenmiştir.

Tablo 3.1. Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de bazı antioksidan ve detoksifikasyon enzim aktivitelerindeki değişimler.

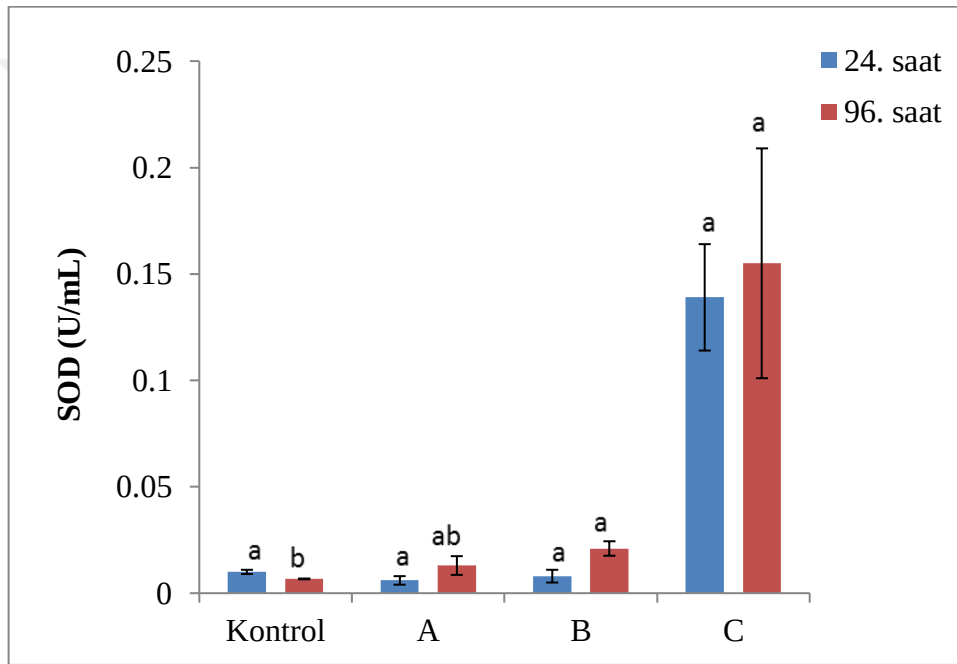
	Biyokimyasal	24.saat	96.saat
SOD(U/ml)	Kontrol	0,010±0,001 ^a	0,0067±0,0002 ^b
	A	0,006±0,002 ^a	0,0131±0,0044 ^{ab}
	B	0,008±0,003 ^a	0,0217±0,0034 ^a
	C	1,39±0,25 ^a	1,55±0,54 ^a
KAT(nmol/dk/ml)	Kontrol	4,92±0,21 ^a	5,2±0,9 ^b
	A	4,69±0,42 ^a	11,56±0,6 ^{a*}
	B	6,14±0,45 ^a	12,95±2,093 ^{a*}
	C	9,13±0,49 ^a	6,24±0,82 ^{b*}
GST(nmol/dk/ml)	Kontrol	2,97±0,57 ^b	2,97±0,57 ^a
	A	6,95±0,57 ^a	2,64±0,66 ^{a*}
	B	2,31±0,33 ^b	5,2±0,66 ^{a*}
	C	2,97±0,57 ^b	3,97±1,1 ^a
CYP1A1(pg/ml)	Kontrol	153,7±5,12 ^a	150,0±8,31 ^a
	A	145,6±2,84 ^a	136,2±4,42 ^a
	B	147,4±6,89 ^a	143,1±3,52 ^a
	C	162,5±5,29 ^a	146,9±7,59 ^a

Üst simgedeki a, b ve c harfleri aynı saatteki farklı uygulama grupları arasındaki farkı gösterir. * aynı uygulama grupta uygulama süreleri (24. ve 96. saatler) arasındaki istatistiksel farkları göstermektedir.

3.1.1. SOD Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda Di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de SOD enzim aktivitesindeki değişimler araştırılmış olup sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. SOD aktivitesinin kontrol ile kıyaslandığında 24. saatte A ve B gruplarında azaldığı, C grubunda ise arttığı gözlenmiştir ($p>0.05$). Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm gruplarda 96. saatte bir artış saptanmıştır ($p<0.05$).

Maruz kalma süreleri karşılaştırıldığında ise; 96. saat sonunda enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte bir artış görülmüştür (Tablo 3.1) (Şekil 3.1).



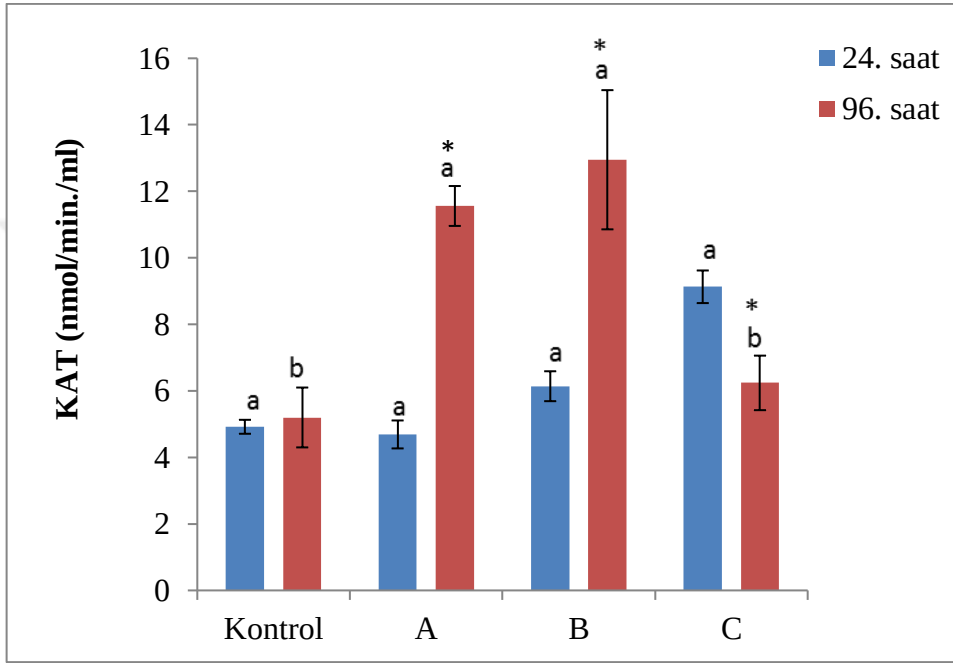
Şekil 3.1.Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de SOD enzim aktivitesindeki değişimler .(C grubunda değerler 1/10 olarak yansıtılmıştır). Barlar üzerindeki farklı harfler aynı uygulama periyodunda gruplar arası istatistiksel olarak fark olduğunu göstermektedir, ^{abc} $p<0.05$ (Duncan's çoklu karşılaştırma testine göre). *; aynı uygulama grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (Bağımsız T testi).

3.1.2. KAT Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de KAT enzim aktivitesindeki değişimler araştırılmış olup sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında farklı dozlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de KAT aktivitesi 24. saat sonunda B ve C gruplarında artmış, A

grubunda ise azalmıştır fakat bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). 96. saat sonunda ise KAT aktivitesinin tüm uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p<0.05$).

24. saat ile 96. saat sonuçları karşılaştırıldığında 96. saat sonrasında KAT aktivitesinde A, B ve C gruplarında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo 3.1) (Şekil 3.2).



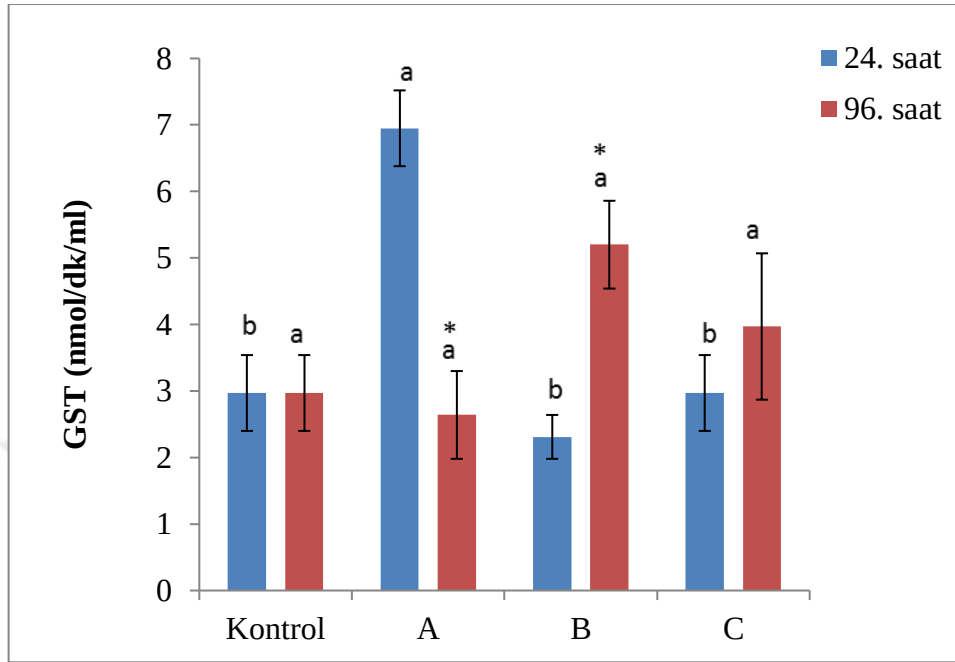
Şekil 3.2 Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de KAT enzim aktivitesindeki değişimler. Barlar üzerindeki farklı harfler aynı uygulama periyodunda gruplar arası istatistiksel olarak fark olduğunu göstermektedir, ^{abc} $p<0.05$ (Duncan's çoklu karşılaştırma testine göre). *; aynı uygulama grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (Bağımsız T testi).

3.1.3. GST Aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de GST enzim aktivitesindeki değişimler araştırılmış olup sonuçlar Tablo 3.1' de gösterilmiştir. GST aktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında A grubunda artmış ($p<0.05$), B grubunda azalmış, C grubunda ise değişmemiştir ($p>0.05$). 96. saat sonrasında ise; A grubunda azalmış, B ve C grubunda ise artmıştır ($p>0.05$).

Uygulama süreleri karşılaştırıldığında, A grubunda 96.saat sonrasında GST enzim aktivitesi azalırken ($p<0.05$), B grubunda istatistiksel olarak önemli bir artış ($p<0.05$), ve C

grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptanmıştır ($p>0.05$) (Tablo 3.1) (Şekil 3.3).



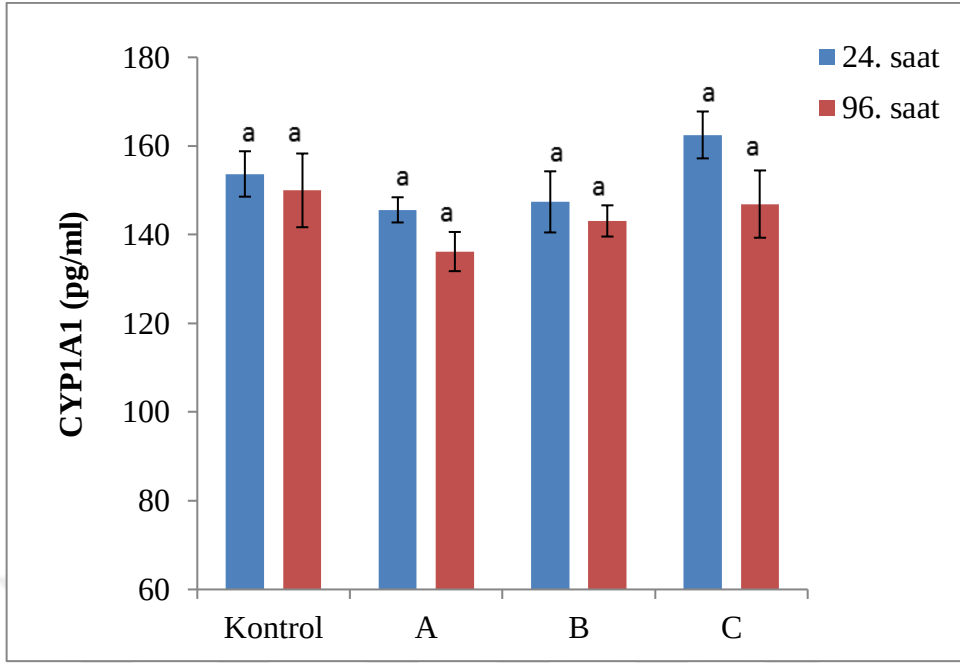
Şekil 3.3 Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de GST enzim aktivitesindeki değişimler. Barlar üzerindeki farklı harfler aynı uygulama periyodunda gruplar arası istatistiksel olarak fark olduğunu göstermektedir, ^{abc} $p<0.05$ (Duncan's çoklu karşılaştırma testine göre). *; aynı uygulama grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (Bağımsız T testi).

3.1.4. CYP1A1 Düzeyleri

Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de CYP1A1 düzeylerindeki değişimler araştırılmış olup sonuçlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

24. saat sonunda CYP1A1 düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında A ve B gruplarda azalırken, C gruplarında artış gözlenmiştir ($p>0.05$). 96. saat sonunda ise; tüm uygulama gruplarında azalış görülmüştür ($p>0.05$).

Farklı uygulama süreleri karşılaştırıldığında ise; CYP1A1 düzeyleri 96. saat sonrasında tüm uygulama gruplarında azalış göstermiştir ($p>0.05$) (Tablo 3.1) (Şekil 3.4).



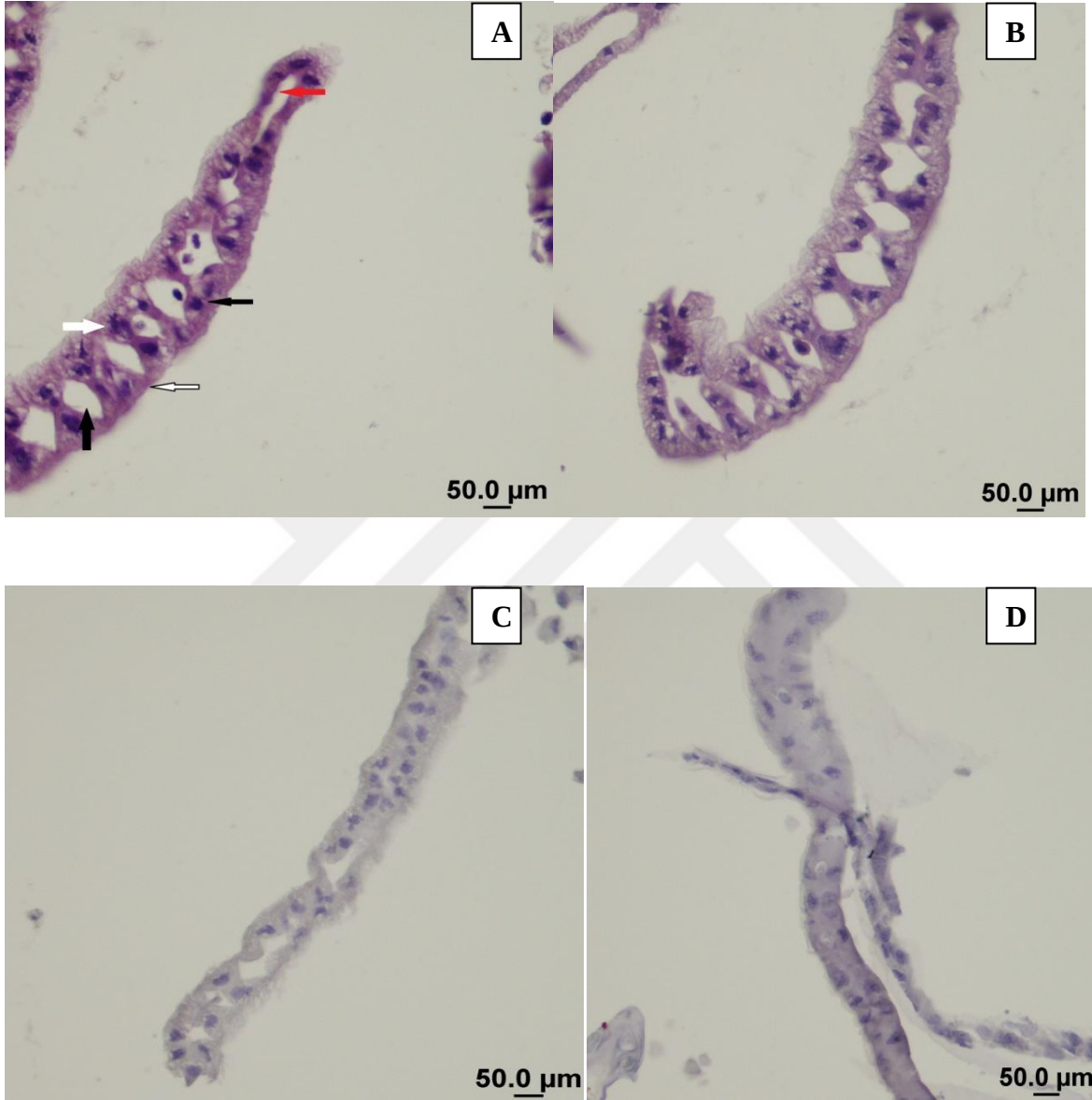
Şekil 3.4 Farklı konsantrasyonlarda di-(2-etilhekzil) fitalat'a maruz kalan *Gammarus pulex*'de CYP1A1 enzim aktivitesindeki değişimler. Barlar üzerindeki farklı harfler aynı uygulama periyodunda gruplar arası istatistiksel olarak fark olduğunu göstermektedir, ^{abc}p<0.05 (Duncan's çoklu karşılaştırma testine göre). *; aynı uygulama grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir (Bağımsız T testi).

3.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Gammarus pulex'in de dahil olduğu Gammaridae Amphipodaları, 3-8. torakopodlara bağlı tek coxal solungaçlara (epipodlar) sahip olmasıyla karakterize edilmiştir. Çoğu Amphipodanın solungaçları, sıklıkla kısa bir sapla peraeopodlara bağlanmış ince, düz ve oval yapılar olarak görülmektedir (Steele and Steele, 1991). Histolojik olarak coxal solungaçların tüm duvarları ince bir kütikül tabakası ile kaplı epiteliyal hücrelerin tek bir tabakasından oluşmaktadır. Solungaçın karşılıklı duvarları, kan akımı için birkaç kompartmana bölünmüş sinüzoid benzeri büyük bir hemosöl elde etmek için pillar (sütun) parçalarının ekleri ile sıkça bir arada tutulmaktadır (Takeuchi ve ark., 2003). Hemosöl veya hemolenfatik kanallar, karşılıklı epitel tabakalarını ayıran sütunlarla sınırlandırılmıştır. Solungaçların uçlarında, daha büyük hemolenfatik boşluklar hemolenfatik sinüsleri (marjinal kanal) oluşturmaktadır. Kabuklularda, iyonik regülasyonda rol oynayan ana organlar olan solungaçlar dış ve iç medya arasında pasif ve aktif bir iyonik alışveriş bölgesi oluşturmaktadır (Issartel ve ark., 2010).

Kontrol grubuna ait *G. pulex* model canlılarının ışık mikroskopik incelemesinde; 24. saat ve 96. saat sonrasında deney grupları ile karşılaştırıldığında solungaçlarında herhangi bir

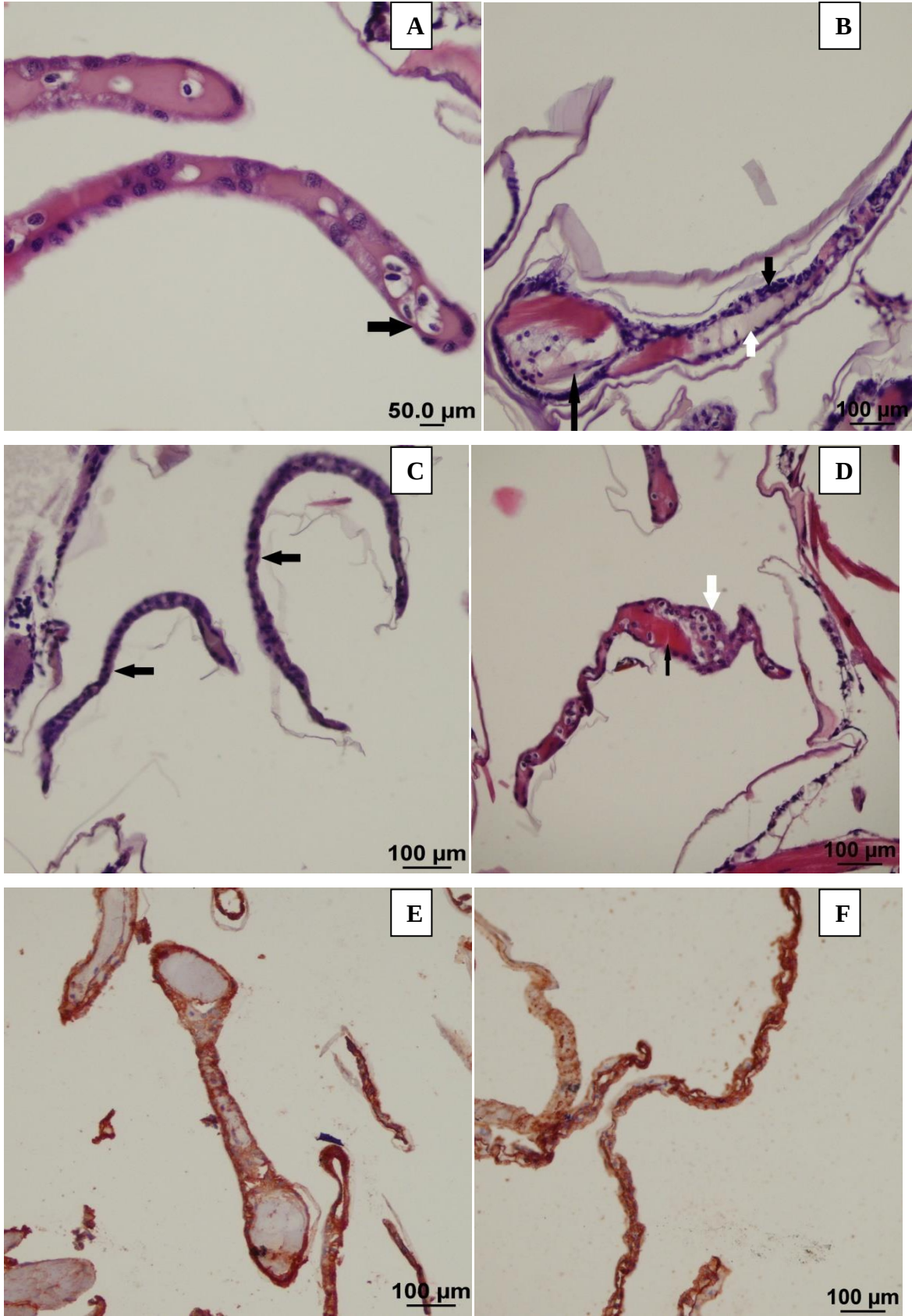
histopatolojik değişikliğin bulunmadığı ve normal morfolojiye sahip oldukları tespit edildi (şekil 3.5.A, şekil 3.5.B). İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanan kesitler incelendiğinde ise pozitif immunoreaktiviteye rastlanmadı (şekil 3.5.C, şekil 3.5.D).



şekil 3.5 Kontrol grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında (A) ve 96. saat sonrasında (B) normal histolojik yapı. Hemosöl-Hemolenfatik kanal-Hemolenfatik lakuna (kalın siyah ok), Pillar (destek) hücresi (kalın beyaz ok), Epitelyum (ince siyah ok), Kütikül tabakası (ince beyaz ok), Hemolenfatik sinus-Marjinal kanal (kırmızı ok) (H&E). Kontrol grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında (C) ve 96. saat sonrasında (D) negatif immunoreaktivite (Caspase-3).

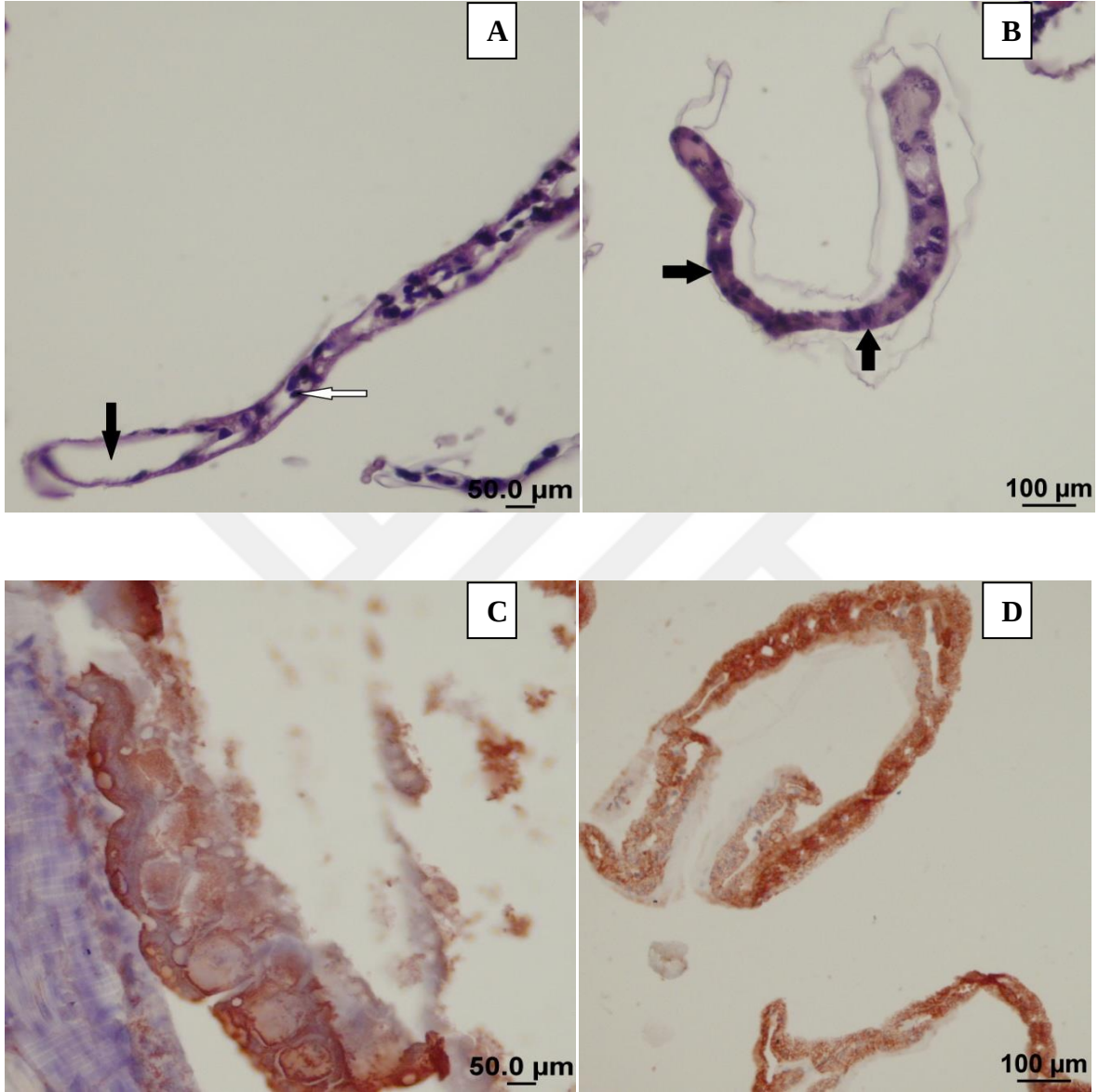
Histopatolojik sonuçlar solungaçın DEHP'dan etkilenen birincil hedef doku olduğunu gösterdi. A grubuna ait *G. pulex* model canlılarının ışık mikroskopik incelemesinde; 24. saat sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaçlarında birçok alanda vakuolizasyon (vakuolleşme), hemostatik infiltrasyon (göç), anormal çekirdek pigmentasyonu, sütunların yokluğu, hemolenfatik kanallarda azalma veya yokluk ve hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna gözlemlendi (Şekil 3.6.A, Şekil 3.6.B). 96. saat sonrasında ise belirtilen bulgulara ilaveten belirgin solungaç kollapsı (çökme) ve hücre proliferasyonu (hiperplazi) belirlendi (Şekil 3.6.C, Şekil 3.6.D). İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanan kesitler incelendiğinde ise şiddetli pozitif immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 3.6.E, Şekil 3.6.F).

B grubuna ait *G. pulex* model canlılarının ışık mikroskopik incelemesinde; 24. saat sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaçlarında birçok alanda vakuolizasyon, anormal çekirdek pigmentasyonu, sütunların yokluğu ve hemolenfatik kanallarda azalma veya yokluk gözlemlendi (Şekil 3.7.A). 96. saat sonrasında ise belirtilen bulgulara ilaveten belirgin solungaç kollapsı belirlendi (Şekil 3.7.B). İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanan kesitler incelendiğinde ise orta yoğunlukta pozitif immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 3.7.C, Şekil 3.7.D).



Şekil 3.6 A grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. ve 96. saat sonrasında meydana gelen histopatolojik değişiklikler. A grubu *G. Pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında vakuolizasyon (ok) (A), anormal nükleus pigmentasyonu (kalın siyah ok), hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna (kalın beyaz ok), hemolenfatik sinus-marjinal kanal (ince siyah ok) (B) ve 96. saat sonrasında kollaps (oklar) (C), hiperplazi

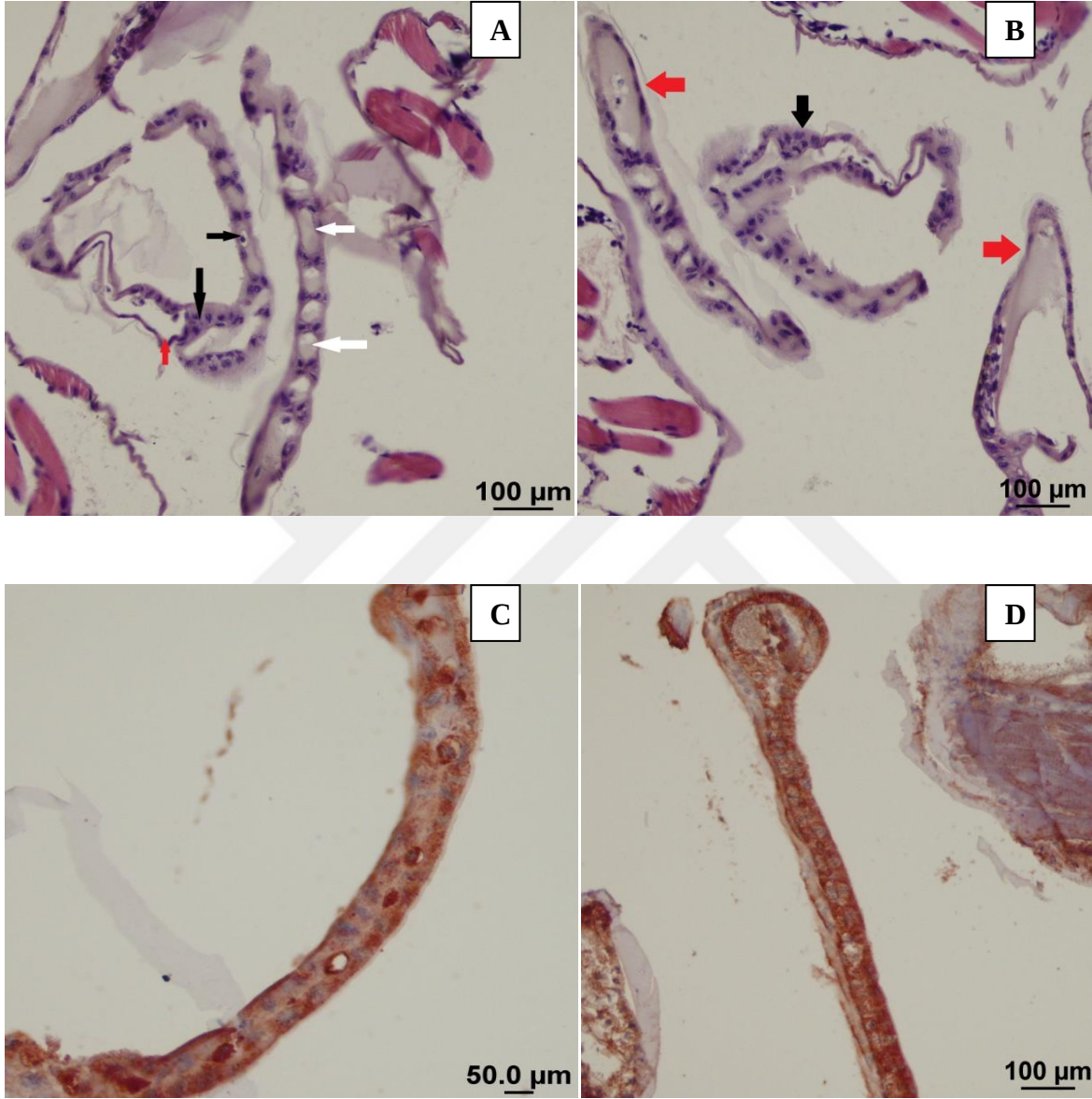
(beyaz ok), hemolenfatik sinus-marjinal kanal (siyah ok) (D) (H&E). A grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında (E) ve 96. saat sonrasında (F) şiddetli pozitif immunoreaktivite (Caspase-3).



Şekil 3.7 B grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. ve 96.saat sonrasında meydana gelen histopatolojik değişiklikler. B grubu *G. Pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında vakuolizasyon (beyaz ok), hemolenfatik sinus-marjinal kanal (siyah ok) (A) ve 96. saat sonrasında solungaç kollapsı (oklar) (B) (H&E). B grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında (C) ve 96. saat sonrasında (D) orta yoğunlukta pozitif immunoreaktivite (Caspase-3).

C grubuna ait *G. pulex* model canlılarının ışık mikroskopik incelemesinde; 24. saat sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaçlarında vakuolizasyon, anormal çekirdek pigmentasyonu, sütunların yokluğu, hemolenfatik kanallarda azalma veya yokluk ve hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna gözlemlendi (Şekil 3.8.A). 96. saat sonrasında ise

belirtilen bulgulara ilaveten solungaç kollapsı ve hiperplazi belirlendi (Şekil 3.8.B). İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanan kesitler incelendiğinde ise orta yoğunlukta pozitif immunoreaktiviteye rastlandı (Şekil 3.8.C, Şekil3.8.D).



Şekil 3.8 C grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. ve 96.saat sonrasında meydana gelen histopatolojik değişiklikler. C grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında vakuolizasyon (kısa siyah ok), anormal çekirdek pigmentasyonu (uzun siyah ok), hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna (beyaz oklar), hemolenfatik sinus-marjinal kanal (kırmızı ok) (A) ve 96. saat sonrasında hiperplazi (siyah ok), hemolenfatik sinus-marjinal kanal (kırmızı oklar) (B) (H&E). B grubu *G. pulex* örneklerinin solungaçlarında 24. saat sonrasında (C) ve 96. saat sonrasında (D) orta yoğunlukta pozitif immunoreaktivite (Caspase-3).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada; di-(2-etilhekzil) fitalat'ın *Gammarus pulex*'de oluşturduğu toksisite biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmiş, bazı antioksidan ve detoksifikasyon enzimleri araştırılmıştır.

Fitalat esterlerin toksisitesi ve kanserojenitesi çeşitli yazarlar tarafından çalışılmıştır (Kapdan ve Kargı, 2000). Mutajenite (Adams, 2002), teratojenite ve fetotoksisite (Dulligan ve Austian, 1973; Tomita ve ark., 1982). *Daphnia magna*'nın üremesi üzerine etki (Brown ve Thompson, 1982), tatlı su amfioidi, *Gammarus pulex*'de fizyolojik bozukluklar ve tuzlu su karideslerinden kuluçkalaması üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Literatüre bakıldığında, kirletici etkileri değerlendirilmek üzere gammaridlerle birçok ekotoksikolojik çalışma yapılmıştır ancak yapılan bu çalışma model canlı olarak *G. pulex* kullanılarak di-(2-etilhekzil) fitalat'ın canlıdaki oluşturduğu toksisitenin hem histopatolojik hem de biyokimyasal olarak incelendiği ilk çalışmadır. Ayrıca, bu çalışma ile çevre kirleticisi fitalatların sucul canlılar üzerine etkilerinin anlaşılması ve kirlilik biyobelirteci olarak yöntem geliştirilmesi için literatüre katkı sağlanmıştır.

Çalışmada, biyolojik belirteç çeşitleri arasında detoksifikasyon enzimlerinden (GST ve CYP1A1), antioksidan enzimlerinden (SOD, KAT) aktivitesi, di-(2-etilhekzil) maruziyetinin etkilerini öngörmeye biyolojik belirteç olarak kullanılmıştır.

Ksenobiyotik-metabolize edici enzim aktivitelerinin değiştirilmesi, yabancı bileşiklerin metabolizmasını ve/veya toksisitesini etkileyebilir. GST ksenobiyotiklerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda yer alan önemli konjugasyon enzimleridir (Seriner, 2010). Yapılan bir çalışmada tatlısu bagrid yayın balığı *Psödobagrus fulvidraco*'nun karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında dietilheksil fitalat (DEHP)'in çeşitli oksidatif stres tepkilerine etkileri laboratuvar koşullarında araştırılmıştır. Balıkların oksidatif stres yanıtları, glutatyon (GSH) seviyesinin yanı sıra glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini analiz ederek değerlendirilmiştir. DEHP'in oksidatif stresi indüklediği ve karaciğerin ise; bu durumdan çok etkilenen organ olduğu önerilmiştir. Bu değişiklikler, artmış GST aktivitelerinin muhtemelen yüksek DEHP seviyelerine maruz kalma için metabolik bir adaptasyon olduğunu ve oksidatif hasara karşı bir savunma mekanizmasının devreye sokulduğunun göstergesidir.

Yapılan benzer çalışmalarda DEHP'a maruz kalındığında da benzer bir şekilde GST aktivitesinde artışlar gözlemlenmiştir.

SOD ve KAT enzimleri oksijen toksisitesine karşı ilk savunma sistemidir (Zagal ve Mazmancı, 2011). SOD, oksijen türevi serbest radikallere karşı, reaktif ve toksik süperoksit radikallerini hidrojen peroksit (H_2O_2) haline dönüştüren ilk savunma hattıdır (Duman ve Kar, 2015). KAT, H_2O_2 'i hücelere zararsız olan toksik olmayan H_2O ve O_2 'e indirgemektedir (Li ve ark., 2012). Halliwell ve ark.(1995)yaptıkları çalışmada, 24. saat sonunda DEHP'e maruziyet sonrası *Daphnia magna*'da SOD ve faz II detoksifikasyon enzimi olan GST enzimlerinde artış, 48. saat sonrasında ise her iki enzimin seviyelerinde de bir inhibisyon saptamışlardır. KAT enzim aktivitesinde de bir inhibisyon görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada, DEHP uygulamasına bağlı olarak testiküler oksidant/antioxidant durum araştırılmıştır. KAT, SOD ve GST aktivitelerindeki değişimleri incelemişlerdir. SOD aktivitesinin DEHP uygulan grupta düşüğünü, KAT aktivitesinin kontrole göre neredeyse iki katı arttığı, GST aktivitesinin ise değişmediğini bulmuşlardır. Dibütil fitalat, organik kirleticiler ve ağır metaller gibi pekçok kirleticiler *Cyprinus carpio*, carp ve blue mussels'de KAT aktivitesini arttırdığı bulunmuştur. Akhtar ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada, 60 gün boyunca sıçanları di-etilhekzil fitalatta maruz bırakmışlardır. Uygulama sonrasında sıçanların karaciğer, böbrek ve kan/plazma'larında SOD, KAT ve H_2O_2 seviyelerinin önemli derecede düştüğünü bulmuşlardır. Sonuç olarak Di-Etilhekzil Fitalatın in-vitro olarak oksidatif strese, mutajeniteye, oksidatif strese bağlı DNA hasarına ve sitotoksositeye neden olduğunu önermişlerdir. Shen ve ark. (2019), dibütil fitalat'ın *Daphnia magna* üzerine toksik etkileri araştırılmıştır. KAT ve GST aktivitelerinin önemli düzeyde düştüğü bulunmuştur. SOD seviyelerinin ise; 0.5 mg/L DBP'a maruziyet sonrası arttığı daha sonra daha yüksek konsantrasyonlara daha uzun maruziyetle birlikte azalmaya başladığı görülmüştür. Turja ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *Gammarus oceanicus* 'u 48 ve 96 saat boyunca di-etilhekzil fitalatta maruziyet sonrasını antioksidan enzim GST, glutatyon, katalaz KAT ve SODaktivitesindeki değişimleri incelemişlerdir. *Gammarus oceanicus* uygulama sonrası farklı biyokimyasal cevaplar vermiş olup, kullandıkları türün bioizleme için uygun olduğunu önermişlerdir. Barrosa ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, oksidatif stresin biyokimyasal belirteçlerini (katalaz, GST ve lipid peroksidasyonu ve asetilkolinesterazı) nasıl etkilediğini *Gammarus locusta*'da kronik triklokarban uygulamasına bağlı olarak araştırmışlardır. Biokimyasal biyobelirteçlerde önemli değişiklikler bulmuşlardır fakat oksidatif stres

biyobelirteçlerinin doz bağımlı bir eğri çizmediğini önermişleridir. Ağuş (2014), Di-N-bütıl fitalat'ın sazan balıklarında (*Cyprinus carpio*) SOD ve CYP1A üzerine toksik etkilerinin moleküler düzeyde araştırmıştır. CYP1A mRNA seviyelerinin solungaç dokusunda 4. saatte 7 kat, 24. saatte 1,22 kat ve 96. saatte 2,15 kat arttığını, karaciğerde ise bunun tersine, sırasıyla 1,76 kat, 8,46 kat ve 1,08 kat azaldığını bulmuşlardır. SOD mRNA seviyelerinde solungaçlarda anlamlı değişim gözlenmemiştir. Karaciğerde ise mRNA seviyeleri 4. ve 24. saatlerde sırasıyla 2,58 ve 2,67 kat, 96. saatte 10,82 kat artmıştır. Kirleticilerin neden olduğu oksidatif stres SOD enziminin tükenmesine yol açmış olabilir SOD'daki artışın H₂O₂ birikimine yol açabileceği ve bunun da KAT'ın işlevini sınırlayacağı düşünülmektedir (Li ve ark., 2012). Kirleticilerin neden olduğu oksidatif stres SOD ve KAT enzimlerinin tükenmesine yol açmış olabilir ve bu tükeniş antioksidan sistemin başarısızlığını yansıtabilir (Li ve ark., 2012).

Bizim çalışmamızda ise; 96.saat sonrasında SOD aktivitesinde görülen artışın, artan süperoksit anyonlarından kaynaklanabilecek muhtemel hasarlardan korunmak için adaptif bir yanıt olabileceği kanaatindeyiz. Çalışmamızda GST aktivitesinin de 96. saat sonunda arttığı görülmüştür. Organizma GST aktivitesini DEHP'ten kaynaklı hasarı telafi etmek için arttırmıştır. Katalaz aktivitesinde bizim çalışmamızda her iki uygulama periyodu sonrasında genel anlamda bir artış görülmüştür. Organizma meydana gelen oksidatif stres durumu ile başa çıkabilmek için KAT enzim aktivitesini arttırmıştır.

Sitokrom P450'ler ksenobiyotiklerin metabolizmasında yer alan faz II enzimleri olup, fizyolojik koşullar altında serbest radikallerin üretilmesine de katkıda bulunmaktadır (Peltola ve ark., 1996; Hanukoglu., 2006). Yapılan çeşitli çalışmalarla DEHP'in çeşitli sitokrom p50 enzimleri üzerine etkileri çalışılmıştır. Nims ve ark. (1994), yaygın olarak kullanılan plastikleştirici madde di-(2-etilheksil) fitalat, ağırlıklı olarak CYP4A alt ailesinin indüklenmesini sağladığını belirtmişlerdir. Seovd (2004), ratlarda ksenobiyotik metabolize edici enzimleri araştırmışlardır. DEHP uygulanan gruplarda (200 and 1000 mg/kg) kontrole kıyasla CYP1A2 CYP3A aktivitelerinin düşüş gösterdiği saptanmıştır. DEHP'in CYP1A1 grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüşe neden olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmada bir FAZ II enzimi olan GST aktivitesi de belirlenmiş olup, Ratlarda 50 mg/kg uygulama sonrasında GST aktivitesinde bir değişiklik olmazken, daha yüksek dozlarda GST aktivitesinin kontrole kıyasla %75 oranında azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç, CYP1A1 ve CYP1A2 faaliyetlerinin DEHP ile inhibe edildiğini gösteren daha önce Agarwal ve ark.

(1982) ve Sharma ve ark. (1989) çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir. Agarwal ve ark. (1982)'nin vitro koşullarda DEHP'in metaboliti olan mono- 2 etil hekzil fitalat tarafından da aynı inhibisyon etkisinin yaratıldığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda dadaha önce yapılan çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiş olup, DEHP uygulamasına bağlı olarak 24. saat sonrasında CYP1A1 düzeyleri kontrol ile kıyaslandığında A ve B gruplarda azalırken, 96. saat sonrasında ise; tüm uygulama gruplarında azalış göstermiştir. Farklı uygulama süreleri karşılaştırıldığında ise; CYP1A1 düzeyleri 96. saat sonrasında tüm uygulama gruplarında azalış göstermiştir ($p>0.05$) (Tablo3.1) (Şekil 3.4). Elde edilen bu sonuçlara göre; DEHP'in CYP1A1 enziminin post-transkripsiyonel baskılanmasına neden olduğu ve DEHP'in CYP1A1 mRNA'sında bir artışa neden olup, miktarının veya enzimatik aktivitesinin artmasına neden olmadığı düşüncesindeyiz (Sies ve ark., 1991).

DEHP'in farklı canlı türleri üzerindeki toksik etkileriyle meydana gelen histopatolojik değişiklikler ile ilgili birçok çalışmanın bulunduğu rapor edilmiştir. Alleve ve ark. (1995) yaptığı çalışmada, Disbütil fitalat (DIBP)'in sıçan karaciğeri üzerine histopatolojik etkilerini araştırmışlardır. Sonuç olarak DIBP'in hepatotoksik olduğu ve karaciğer dokusunda geri dönüşümü olmayan ciddi histopatolojik değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Göktekin (2016), prenatal dönemde diheksil fitalat ve disikloheksil fitalata maruziyetin erkek ve dişi sıçanların bazı endokrin dokuları üzerindeki etkilerini incelemiştir ve histopatolojik incelemelerde özellikle yüksek doz DHP ve DHP verilen gruplarda çeşitli histopatolojik bozukluklar gözlenmiştir. Adrenal bezde hücresel dejenerasyon, kapsülde kalınlaşma, ödem ve konjesyon; pankreasın Langerhans adacığında dejenerasyon; tiroid dokusunda foliküllerde bozulma, yağ dokuda artış, mononükleer hücre infiltrasyonu ve koloidal bozulma; hipofiz bezinde hücresel dejenerasyon ve konjesyon tespit edilen değişikliklerden bazılarıdır. Ahmad(1995), prepubertal gelişim dönemindeki ratlara farklı sürelerde aynı dozda DEHP verilerek oluşturulan testis hasarı üzerine ginkgo biloba ekstrakt 761 (EGb 761)'in koruyucu etkisi mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelemiştir. Tüm deney periyotları boyunca kontrol grubuna kıyasla DEHP grubunda MDA, GSH-Px ve KAT seviyelerinde yükselme; GSH düzeylerinde azalma tespit edilmiştir. TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmelerde kontrole göre DEHP grubunda; 7. günde spermatogenik hücrelerde apoptozisin arttığı, 14. ve 28. günlerde ise bir önceki deney periyoduna göre kademeli olarak azaldığı ortaya konmuştur. Yetişkin erkek Zebra balıklarının (*Danio rerio*) üreme biyolojisi üzerine yapılan histolojik çalışmalar, 0.2 mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarındaki DEHP'a nispeten kısa

sürekli maruz kalmanın spermatogenezi değiştirebileceğini ve üremeyi etkileyebileceğini gösterilmiştir (Corradetti ve ark., 2013). Başka bir çalışmada taze su balıklarından *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852)'un solungaç ve karaciğerinde DEHP indüklü histopatolojik değişiklikler incelendiğinde; konsantrasyon bağımlı durumda lamel epitelinin yükselmesi ve şişmesi, eritrositlerin infiltrasyonu, anevrizma, primer ve sekonder lamellerin kaybı, sekonder lamellerin kısalması ve kıvrılması ile solungaç lamelinin tam yıkımı gibi bulguların görüldüğü belirtilmiştir (Revathy ve Chitra, 2015).

Literatür incelemeleri sonucunda DEHP'in *Gammarus* türü sucul biyoindikatör organizmalarında sebep olduğu toksisite sonucu meydana gelen histopatolojik değişiklikleri inceleyen çalışmaların üzerinde yoğunlaşmadığı gözlenmiştir. Fakat nadir de olsa bazı çevresel kirleticilerin *Gammarus* türleri üzerindeki toksik etkileri neticesinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin incelendiği birkaç ışık mikroskopik çalışmanın bulunduğu dikkati çekmiştir.

Issartel ve ark. (2010)'nın kadmiyumun *Gammarus fossarum* üzerindeki toksik etkisini araştırmak için yaptıkları çalışma, toksik bileşiklerin Gammaridean türlerinin solungaçları üzerindeki histopatolojik etkileri üzerine yapılan nadir çalışmalardan biridir. Araştırmada *G. fossarum*'da kadmiyuma maruz kalmanın hücresel ve moleküler osmoregülatuar tepkilerini araştıran çalışmacılar, 3 gün boyunca 15 µg/l kadmiyum maruziyetinin özellikle anormal çekirdek pigmentasyonuna ve sütunların yokluğuna neden olduğunu; bunun da kontrollere kıyasla solungaç kalınlığının %71 oranında azalmasıyla bağlantılı olduğunu ve hemolenf kanallarının azalması veya yokluğu ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir. Ayrıca hiperplazik solungaçlarda birkaç anevrizmanın varlığını, belirgin solungaç kollapsını ve solungaç hacminde artış gösteren hücre hiperplazisini belirlemişlerdir. Uğurlu ve ark. (2015), thiamethoxam pestisitinin *Gammarus kischineffensis*'in solungaç dokusu üzerindeki akut toksisitesini ve histopatolojik etkilerini incelemiştir. Çalışmacılar, 14 gün boyunca 0.004, 0.04 ve 0.4 mg/l thiamethoxam konsantrasyonlarına maruz kalan *G. kischineffensis* bireylerinin solungaçlarındaki yaygın histopatolojik değişikliklerin vakuolizasyon ve hemostatik infiltrasyon olduğunu; bununla birlikte pillar (destek) hücrelerinde gözlenen kollapsın bir sonucu olarak hemosöl lakuna atrofisini tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

Toksik bileşiklerin kabuklu hayvan türlerinin solungaç dokuları üzerindeki histopatolojik etkileri hakkında da birçok çalışma yapılmıştır. Li ve ark. (2007), su kaynaklı

bakırın, tatlı su karidesi *Macrobrachium rosenbergii*'nin (Crustacea: Decapoda) solungaçları ve hepatopankreası üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada 0.01 mg/l bakır konsantrasyonuna maruz kalan bireylerin solungaçlarında epitelyal kalınlaşma ve solungaç lamellerinde şişme belirlenirken 0.05 mg/l bakır konsantrasyonuna maruz kalan bireylerin solungaçlarında ise, hemosöl lakunada hemostatik infiltrasyon ve filamentlerin füzyonu tespit edilmiştir. Bhavan ve Geraldine (2000), bir organoklorin pestisit olan endosülfanın subletal konsantrasyonunun, *M. malcolmsonii*'nin solungaç dokusu üzerindeki histopatolojik etkilerini incelemiştir. Araştırmacılar, 10.6 ng/l endosülfana maruz kalan bireylerin solungaçlarında hemosöl lakunada hemostatik infiltrasyon, solungaç lamellerinde ödem, lamel epitelinin kaldırılması ve lamellerin füzyonu görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca en yüksek endosülfan konsantrasyonunda (32.0 ng/l) solungaç lamellerinde şişme, kalınlaşma ve füzyon ile nekroz tespit etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda histopatolojik sonuçlar solungaçın DEHP'dan etkilenen birincil hedef doku olduğunu göstermiştir. A, B ve C grubuna ait *G. pulex* model canlılarının ışık mikroskopik incelemesinde; 24. saat sonrasında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında solungaçlarında birçok alanda vakuolizasyon (vakuolleşme), hemostatik infiltrasyon (göç), anormal çekirdek pigmentasyonu, sütunların yokluğu, hemolenfatik kanallarda azalma veya yokluk ve hemolenf ile dolu hemolenfatik lakuna gözlenmiştir. 96. saat sonrasında ise belirtilen bulgulara ilaveten belirgin solungaç kollapsı (çökme) ve hücre proliferasyonu (hiperplazi) belirlendi. İmmunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyanan kesitler incelendiğinde ise A grubunda şiddetli pozitif immunoreaktiviteye rastlanırken B ve C gruplarında orta yoğunlukta bir immunoreaktiviteye rastlanmıştır.

5. SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre; DEHP'in *G.pulex* üzerine toksik etkiye sahip olduğu ve DEHP'den kaynaklanan kirliliğin çevresel bir tehdit oluşturabileceği düşünülmektedir.

Endokrin bozucu bir kimyasal olan DEHP'in *G. pulex*'de yarattığı toksik etkilerin araştırılmasında kullandığımız biyobelirteçlerden SOD, KAT ve GST'nin yararlı birer biyobelirteç olduğu, CYP1A1'de ise istatistiksel olarak anlamlı değişimler gözlenmemesinden dolayı biyobelirteç olarak kullanılmasının uygun olmadığı kanaatine varılmıştır. Sonuç olarak, antioksidan enzimlerden olan SOD, KAT ve detoksifikasyon enzimlerinden olan GST'deki değişikliklerin potansiyel olarak çevre içindeki risk değerlendirmesi için hassas biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği ve deşarj düzenlemelerinin yapılmasına katkıda bulunabileceği önerilmektedir.

Elde edilen bulgulara göre uygulama sürelerinin ve dozlarının biyokimyasal yanıtı değiştirdiği görülmüştür.

Model canlının ışık mikroskobu incelemesinde; DEHP uygulamasının özellikle de *Gammarus pulex* solungaçlarında hasara neden olduğu, uygulama dozları ve uygulama sürelerindeki artışa bağlı olarak *Gammarus pulex*'de meydana gelen immunoreaktivitenin arttığı gözlenmiştir.

6. ÖNERİLER

Endokrin bozucu kimyasallar büyük ölçekte insan ve yaban hayatı etkilemeden önce kamu bilincinin yükseltilmesi gerekmektedir.

Endokrin bozucuların zararlı etkileri ile ilgili yazılı ve elektronik medya ortamları kullanılarak halk bu konuda bilinçlendirilmelidir.

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler arasında endokrin bozucu kimyasalların toksik etkileri hakkında daha fazla bilgi paylaşımı yapılmalı ve boşlukları kapatmaya yardımcı olması için daha fazla işbirlikçi bir çalışma prensibi benimsenmelidir.

Kamu ayrıca, bu toksik maddelerin üretimi, ithalatı ve kullanımı ile ilgili insanları caydırarak, bu kimyasalların farkındalığında ve en aza indirilmesinde yaratılan politikaların etkin bir şekilde uygulanmasında politika yapıcılara yardımcı olmaya teşvik edilmelidir.

Bu endokrin bozucuların neden olduğu sorunların azaltılabilmesi için mevzuat sürecimizi gözden geçirmek ve politika yapıcılara özel fikirler vermek de gerekebilir.

KAYNAKÇA

- Alleva, E., Brock, J., Brouwe, A., Colborn, T., Fossi, C., Gray, E., Guillette, L., Hauser, P., Leatherland, J., MacLusky, N., Mutti, A., Palanza, P., Porterfield, S., Santti, R., Stein, S.A., vom Saal, F., Weiss, B., 1995.** Consensus Statement from the work session on environmental endocrine disrupting chemicals: neural , endocrine and behavioural effects, held at Erice, Sicily, November 5-10.
- Allsopp, M., Santillo, D., Johnston, P., 1997.** Poisoning the Future: Impacts of Endocrine Disrupting Chemicals on Wildlife and Human Health, Greenpeace Research Laboratories, Dept. Biological Sciences, University of Exeter,UK. (in reports section).
- Alexopoulos, E., McCrohan, C.R., Powell, J.J., Jugdaohsingh, R., White, K.N., 2003.** Bioavailability and Toxicity of Freshly Neutralized Aluminium to the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 45(4): 509-514.
- Antmen, Ş.E., 2005.** Beta Talasemide Oksidatif Stres, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Arteel, G.E., Sies, H., 2001.** The Biochemistry of Selenium and the Glutathione System. Environ. Toxicol. Pharmacol., 10, 153–158.
- Ahmad, S., 1995.** Oxidative stres and antioksidant defenses in biology Chapman and Hall Inc, London, 447s.
- Adams, M.S., 2002.** Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. American Fisheries Society, Bethesda, Mayland, 644 s.
- Barnard, J.L., Barnard, C.M., 1983.** Freshwater Amphipoda of the World. I. Evalutionary Patterns, I-VIII, IX-XVIII, 1-358; II. Handbook and Bibliography, XIX, 359- 830. Hayfield Ass., Mt. Vernon, Va., U.S.A.
- Barthold, J.S., Kryger, J.V., Derusha, A.M., Duel, B.P., Jendak, R, Skafat, D.F., 1999.** Effenct ofan environmental endocrine disruptor on fetaldevelopment, estrogenreceptor(alpha) and epidermal growth factor receptor expression in the porcinemale genital tract. J Urol; 162: 864-871.
- Bang, D.Y., Kyung, M., Kim, M.J., Jung, B.Y., Cho, M.C., Choi, S.M., Kim, Y.W., Lim, S.K., Lim, D.S., Won, A.J., Kwack, S.J., Lee, Y., Kim, H.S., Lee, B.M., 2012.** Human risk assessment of endocrine-disrupting chemicals derived from plastic food containers. 44, 56-61.
- Başak, E., 2011.** Modifiye edilmiş kitosan boncuklar üzerine katalaz enzimininimmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, 53s, Manisa.

- Bat, L., Akbulut, M., Çulha, M., Gündoğdu, A., Satılmış, H.H.,** 2000. Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex* (L., 1758), *Turkish Journal of Zoology*, 24, 409-415.
- Beck, I.C., Bruhn, R., Gandrass, J.,** 2006. Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen. *Chemosphere*, 63, 1870-1878.
- Behr, M., Oehlmann, J., Wagner, M.,** 2011. Estrogens in daily diet: In vitro analysis indicates that estrogenic activity is omnipresent in foodstuff and infant formula. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 2681-2688.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T.,** 1999. Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution. *J. Fish Dis.* 22, 25-35.
- Bhavan, P.S., Geraldine, P.,** 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquat. Toxicol.* 50, 331–339.
- BriggsReed, L.M., Heagler, M.G.,** 1997. A Comparative Analysis of Lead Concentrations in Purged and Unpurged Crayfish (*Procambarus clarkii*): The Significance of Digestive Tract Removal Prior to Consumption by.
- Brown, S.B., Evans, R. E., Vandenbyllardt, L., Finnson, K.W., Palace, V.P., Kane, A.S., Yarechewski, A.Y., Muir, D.,** 2004. Altered thyroid status in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology*, 67(1), 78-85.
- Bjorkblom, C., Mustamaki, N., Olsson, P., Katsiadaki, I., ve Wiklund, T.,** 2011. Assessment of reproductive biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from sewage effluent recipients. *Environmental Toxicology*, 28, 229–237.
- Bistan, M., Podgorelec, M., Logar, R.M., Tisler, T.,** 2012. Yeast estrogen screen assay as a tool for detecting estrogenic activity in water bodies. *Food Technology and Biotechnology*, 50, 427-433.
- Carnevali, O., Tosti, L., Speciale, C., Peng, C., Zhu, Y., Maradonna, F.,** 2010. DEHP Impairs Zebrafish Reproduction by Affecting Critical Factors in Oogenesis. *PloS ONE* 5, e10201.
- Corradetti, B., Stronati, A., Tosti, L., Manicardi, G., Carnevali, O., Bizzaro, D.,** 2013. Bis-(2-ethylexhyl) phthalate impairsspermatogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproductive Biology*, 13, 195-202.
- Çetin, Ç.,** 2011. Koroner Arter Ektazi Hastalarında Oksidatif Dna Hasarı, Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Antioksidant Enzimler (yüksek lisans tezi, basılmamış), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Van.

- Çetinkaya, S.,** 2009. Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri, Dicle Tıp Dergisi,36, 59-66.
- Çobanoğlu, U., Demir, H., Cebi, A., Sayır, F., Alp, H.H., Akan, Z., Gur, T., Bakan, E.,** 2011. Lipid peroxidation, DNA damage and Coenzyme Q10 in lung cancer Patients - Markers for Risk Assessment? Asian Pacific J Cancer Prev.,12: 1399-1403.
- Çimen, Ç., Öter, Ç., Demir, H., Savran, A.,** 2005. Rat Eritrositlerinden Elde Edilen Katalaz Enziminin Karakterizasyonu ve Kinetiğinin İncelenmesi. YYÜ Veteriner Fakültesi 16: 15-20.
- Deaton, C.M., Marlin, D.J.,** 2003. Exercise-Associated Oxidative Stress, Clin. Tech. Equine Pract, Vol 2, No 3, 278-291.
- Desbrow, C.E.J.R., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M.,** 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environmental Science and Technology, 32(11), 1549-1558.
- Deveci, A.,** 2007. Mastitisli (Meme İltihabı) İneklerde Kan MDA ve GSH Düzeylerinin Araştırılması (yüksek lisans tezi). KÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- Dix, T.A., Aikens, J.,** 1993. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation, Chem, Res. Toxicol, 6:2-18.
- Dodds, E., Lawson, W.,** 1938. Molecular Structure in Relation to Oestrogenic Activity. Compounds without a Phenanthrene Nucleus. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 125, s. 222-232.
- Dodds, E., Lawson, W.,** 1936. Synthetic, oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus, Nature, 137: 996.
- Dorval, J., Leblond, V.S., Hontela, A.,** 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vitro* to endosulfan, an organochlorine pesticide. Aquatic Toxicology, 63: 229-241.
- Džeroski, S., Demšar, D., Grbović, J.,** 2000. Predicting Chemical Parameters of River Water Quality from Bioindicator Data, Applied Intelligence 13, p. 7-17.
- El-Gohary, M., Awara, W.M., Nassar, S., Hawas, S.,** 1999. Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effect of nitric oxide synthase inhibitor. Toxicology, 132: 1-8.
- Fleisch, A.F., Sheffield, P.E., Chinn, C., Edelstein, B.L., Landrigan, P.J.,** 2010. Bisphenol A and related compounds in dental materials. Pediatrics, 126(4):760-768.
- Fridovich, I.,** 1983. Superoxide Radical: An Endogenous Toxicant. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 23: 239-257.

- Fürhacker, M., Scharf, S., Weber, H.,** 2000. Bisphenol A: Emissions from PointSources. *Chemosphere*,41: 751-756.
- Garewal, H.S.,** 1997. Antioxidants and disease prevention. CRC Press LLC. pp 3-19. Florida.
- Gazea, A., Koukoumides, C., Lazaridou-Dimitriadou, M., White, K.N.,** 1999. Heavy Metals in Tissues of *Gammarus spp.* (Amphipoda, Crustacea), From a Mining Area of Chalkidiki, 6th. Intern Conference on Environmental Science and Technology, Samos, Greece, 30 August – 2 September.
- Gerhardt, A.** 2009. Bioindicator species and their use in biomonitoring. Boris Stepanovich Maslov (Ed), Environmental Monitoring, UNESCO (ed), Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), Oxford, EOLSS.
- Göktekin, E., Barlas, N.,** 2008. Histopathological effects of 4-tert-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal, 93 pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood, *Environ Toxicol Pharmacol.* 26, 199-205.
- Hachfi, L., Couvray, S., Simide, R., Tarnowska, K., Pierre, S., Gaillard, S., Richard, S., Coupé, S., Grillasca, J.P., Prévot-D'Alvise, N.,** 2012. Impact of endocrine disrupting chemicals [EDCs] on hypothalamic-pituitary-gonad-liver [HPGL] axis in fish. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(1), 14-30.
- Halliwell, B.,** 1994. Freeradicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet*, 344: 721.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edn. Oxford: Oxford Science Publications.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.,** 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press Inc. New York, 936s.
- Hamza-Chaffai, A.,** 2014. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3: 19-26.
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., Drevet, J.R.,** 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. Review. *FEBS J.* 274: 2163-80.
- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G.,** 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere*, 81, 701–710.
- Jam, S.K.,** 2006. Oxidative stress and metabolic diseases: Introduction. *Pathophysiology.* 13(3):127-128.

- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I.,** 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impactson human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40, 1, 241-58.
- Kamiloglu, N.N.,** 2002.Tuj Koyunlarında Döl Verimi ve Antioksidatif Savunma Sistemi Üzerine A Vitamini ve -Karoten Enjeksiyonlarının Etkileri, Doktora Tezi, Kafkas Üniv. Sağlık Bil. Enst., Kars.
- Kang, J., Kondo, F., Katayama, Y.,**2006. Human Exposure to Bisphenol A.*Toxicology*, 226: 79-89.Keha, E.E., Küfrevdoğlu, Ö.İ., Biyokimya, Aktif Yayınevi, 241,İstanbul, 2001.,
- Karaman, G.S.,** 1973. 53. Contribution to the Knowledge of the Amphipoda. some new or very interesting Gammarus species from southern Europa and Asia minor, *Polyoprivreda I. Sumarstvo*, XIX(3): 1- 42.
- Karaman, G.S., Pinkster, S.,** 1977. Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda), Part I *Gammarus pulex*-group and related species, *Bijdragen Tot de Dierkunde*, 47: 1-97.
- Kapdan, I. K., Kargı, F.,** 2000. Atıksulardan Tekstil Boyar Maddelerinin Adsorpsiyonlu Biyolojik Arıtım ile Giderimi, *Türk J Engin Environ Sci*,24 , 161 – 169.
- Kavas, G.,** 1989.Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri.*Türkiye klinikleri Dergisi*, 9(1): 2.
- Kazancı, G., Girgin, S., Dügel, M., ve Oguzkurt, D.,** 1997. Akarsuların çevre kalitesi yönünden değerlendirilmesinde ve izlenmesinde biyotik indeks yöntemi [The method of the biotic index of assessment and monitoring with respect to environmental quality of running waters]. İmaj Yayıncılık. ANKARA, 100 s.
- Kelce, W.R. ve Wilson E.M.,** 2001. Antiandrogenic Effects of Environmental Endocrine Disruptors. In: Metzler M (ed). *The Handbook of Enviromental Chemistry, Endocrine Disruptors Part 1*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; p. 39-61.
- Kidd, P.,** 1997. Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Alternative Medicine Reviews* 1997; 2: 155-176.
- Kim, E.J., Kim, J.W., Lee, S.K.,** 2002. Inhibition of Oocyte Development in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to Di-2-Ethylhexyl Phthalate. *Environ. Int.* 28, 359-365.
- Kuniyoshi, L.S., ve Braga, E.S.,** 2010. Cytogenetic disruption in fishes as bioindicator of the Environmental quality in two estuarine systems under different exposition to anthropogenic influences. *Safely, Health and Environment World Congress Book*, Sao Paulo, Brazil, 93-96.

- Khoschsorur, G.A., Winklhofer-Roob, B.M., Rab, P.H., 2000.** Evaluation of a sensitive Hplc method for the determination of malondialdehyde and application of the method to different biological materials. *Chromatographi A*, 52: 181-184.
- Lam, P.K.S., Gray, J.S., 2003.** The Use of Biomarkers in Environmental Monitoring Programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46: 182-186.
- Lee, M.M., 2007.** Endocrine Disrupters. *A Current Review of Pediatric Endocrinology*, 109-118.
- Leroy, D., Haubruge, E., De Pauw, E., Thome, J.P., Francis, F., 2010.** Development of ecotoxicoproteomics on the freshwater amphipod *Gammarus pulex*: identification of PCB biomarkers in glycolysis and glutamate pathways. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 73:343–352.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., ve Wenzel, A., 2003.** Endocrine Disruptors in the Environment. *Pure Appl. Chem.*, 75: 631-681.
- Li, N., Zhao, Y., Yang, J., 2007.** Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 52, 73–79.
- Maffini, M.V., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2006.** Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol. Cell Endocrinol.*, 25: 254- 255.
- Maggioni, T., Hued, A.C., Monferra'n, M.V., Bonansea, R.I., Galanti, L.N., Arne, M.V., 2012.** Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution in the Middle-Lower Basin of the Suquia River (Cordoba, Argentina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 63: 337-353.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., De Castro, I.N., 1999.** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32; 595-603.
- Mayes, P.A., 1991.** The pentose phosphate pathway & other pathways of hexose metabolism. Appleton & Lange, California, 189-198.
- Meister, A., Anderson, M.E., 1983.** Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52:711–760.
- Mercan, U., 2004.** Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet. Fak. Derg.*, 15(1-2): 91-96.
- McLachlan, J.A., Simpson, E., ve Martin, M., 2006.** Endocrine disruptors and female reproductive health, *Best Practice Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20, 46-63.
- Mccord, J.M., Fridovich, I., 1969.** Superoxide Dismutase. An Enzymic Function For Erythrocyte (Hemocytin). *J. Biol. Chem.*, 244 (22):6049-6055.

- Michalowicz, J.**, 2014. Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37, 2, 738-758.
- Nam, S.H., Seo, Y.M., Kim, M.G.**, 2010. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 79, 9, 949-52.
- Osman, A.G.M., Abd El Reheem, A.E.B.M., Abuel-Fadl, K.Y., Gad El Rab, A.G.**, 2010. Enzymatic and histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in fishes. *Natural Science*, 2 (11): 1302-1311.
- Özşahin, E.A., Yazıcı, C., Köse, K., Utaş, C., Tokgöz, B.**, 2004. Hemodiyaliz hastalarında plazma malondialdehit ve tiyol seviyeleri. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 13(2):8-14.
- Revathy, V., Chitra, K.C.**, 2015. Di(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Histopathological Changes In Gill and Liver of Freshwater Fish, *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852). *International Journal of Advanced Research*, 3(9), 263 – 270.
- Roefler, P., Synder, S., Zegers, R.E., rexing, D.J., Fronk, J.L.**, 2000. Endocrine-Disrupting Chemicals in A Source Water, *Journal of AWWA*, 92(8): 52-58.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P.** 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, 32(11), 1559-1565.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G-P.**, 2000. Crustaceans as Bioindicators, *Biomonitoring of Polluted Water – Reviews on Actual Topics* (A. Gerhardt, ed.), Trans Tech Publications – Scitech Publications, *Environmental Research Forum* Vol. 9, p. 161-194.
- Sanchez-Hernandez, J.C.**, 2007. Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assesment of pesticide contamination, *Environmental Pollution: New research*, 1-45.
- Serin, D.S.**, 2010. Supranol Yellow 4 GL boyar maddesi Ve Nikel (II) İyonlarının Portakal Kabuğuna Adsorpsiyonunun Kesikli Ve Sürekli Sistemlerde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Mersin.
- Seriner, R.**, 2010. Katalaz enziminin hiyardan (*cucumus sativus*) saflaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 45s, Adana.
- Sinha Hikim, A.P., Swerdloff, R.S.**, 1999. Hormonal and Genetic Control of Germ Cell Apoptosis in the Testis. *Rev Reprod*, 4: 38-47.
- Solomon, G.M., Schettler, T.**, 2000. Environment and health. 6. Endocrine disruption and potential human health implications. *CMAJ Canadian Medical Association Journal*, 1116: 1467-74.

- Sies, H.**, 1991. Oxidative stress from basic research to clinical application. *The Am J Med.*, 3(91): 31.
- Slaoui, M., Fiette, L.**, 2011. *Histopathology Procedures: From Tissue Sampling to Histopathological Evaluation*. Jean-Charles Gautier (ed.), *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*(Clifton, N.J.), 691: 69-82.
- Sülün, Y.**, 2002. Çevre Kirliliğini Önlemede Eğitimin Rolü, Muğla Üniversitesi, SBE Dergisi, Sayı 8.
- Staples, C.A., Dome, P.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., Harris, L.R.**, 1998. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 10, 2149-2173.
- Steele, D.H., Steele, V.J.**, 1991. The structure and organization of the gills of Gammaridean Amphipoda. *J. Nat. Hist.* 25, 1247–1258.
- Tabb, M.M., ve Blumberg, B.**, 2006. New models of action for endocrine disrupting chemicals, *Mol. Endocrin.*, 20, 475-482.
- Takeuchi, I., Matsumasa, M., Kikuchi, S.**, 2003. Gill ultrastructure and salinity tolerance of *Caprella* spp. (Crustacea: Amphipoda: Caprellidea) inhabiting the Sargassum community. *Fish Sci.* 69, 966–973.
- Tatlı Seven, P., Gül, B.B., Parlak, A.T., Seven, İ., Başak, N., Yaman, M.**, 2018a. The Protective Effects of Propolis and Flunixin Meglumine on Feed Intake, Antioxidant Status and Histological Parameters in Liver and Kidney Tissues Against Excess Copper in Rats. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(4), 395-406.
- Tatlı Seven, P., Gül, B.B., Seven, İ., Parlak, A.T., Başak, N., Gülloğlu, H.**, 2018b. The Protective Effects of Chrysin and Flunixin Meglumine Against Excess Copper in Male Rats. *Türkisch Journal of Veterinary Animal Sciences*, 42(5), 376-387.
- Tejeda-vera, R., Lopez-lopez, E., Sedenio-diaz, J.E.**, 2007. Biomarkers and Bioindicators of the Health Condition of *Ameca splendens* and *Goodea atripinnis* (Pisces: Goodeidae) in the Ameca River, Mexico. *Environmental International*, 33: 521-531.
- Trosko, J.E., Chang, C.C., Upham, B.**, 1998. Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication. *Toxicol Lett*, 102: 71-78.
- Uğurlu, P., Ünlü, E., Satar, E.**, 2015. The Toxicological Effects of Thiamethoxam on *Gammarus kischineffensis* (Schellenberg 1937) (Crustacea: Amphipoda). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39, 720-726.
- Ulukaya, E.**, 2003. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 15- 26.

- Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M.,** 2010. Mechanisms of Toxicity of Di (2-Ethylhexyl) Phthalate on the Reproductive Health of Male Zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 99, 360-369.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA),** 1998. Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.
- Ünal, A.,** 2007. Üriner sistem kanser hastalarında cerrahi tedavi öncesi ve sonrası idrar 8-hidroksideoksiguanozun seviyeleri. Doktora Tezi, Gazi Üniv Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Yagi, K.,** 1987. Lipid peroxides and human diseases. *Chem Phys Lipid*, 45: 337-351.
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., ve Nakasugi, O.,** 2002. Bisphenol A in Hazardous Waste Landfill Leachates. *Chemosphere*, 42: 415-418.
- Yıldız, N.,** 2009. Çevresel östrojenlerden bisfenol-A ve oktilfenolün erkek sıçanlarda subkronik etkileri”, Yüksel Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji A.B.D.Ankara, 23-31.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T.,** 2010. Integrated Biomarkers in Aquatic Organisms as a Tool for Biomonitoring Environmental Pollution and Improved Ecological Risk Assessment. www.chem-tox-ecotox.org, Science advances on Environmental Chemistry, Toxicology and Ecotoxicology issues.
- Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L.,** 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* ; 14: 239-60.
- Yücel, A.,& Morgil, S.,** 1998. “Yüksek Öğretimde Çevre Olgusunun Araştırılması”, *Hacettepe Catalases: Clues from Molecular Evolution and in vitro Mutagenesis*, Prog. Biophys. Mol. Biol., 72, 19-66.
- Zhou, J., Shan Zhu, X., Cai, Z.H.,** 2009. Endocrine disruptors: an overview and discussion on issues surrounding their impact on marine animals. *Journal of Marine Animals and Their Ecology*, 2(2), 7-17.
- Wenzel, A., Muler, J., Ternes, T.,** 2003. Study on Endocrine Disrupters in Drinking Water Final Report, Schmallingenberg and Wiesbaden Env.D.1/Etu/2000/0083.
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., Mclachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M.,** 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 24, 178–198.
- Wu, D., Cederbaum, A.J.,** 2003. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research and Health*; 4: 277-284

- Url-1.**<https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/endokrin-bozucular-sagligi-tehdit-ediyor/>Güncellenme Tarihi: 19 Temmuz 2014- Yayınlanma Tarihi: 19 Temmuz 2014-Alıntı tarihi 05.01.2018
- Url-2.**<https://prezi.com/wpr6ygkiptyw/endokrin-maddeler-ve-cevresel-etkileri/> Alıntı tarihi- 05.01.2018

