

151511

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Demet USTA

DİAZİNONUN *Cyprinus carpio* DOKULARINDA OKSİDATİF
STRES ve NÖROTOKSİSİTE POTANSİYELİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2004

151511

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİAZİNONUN *Cyprinus carpio* DOKULARINDA OKSİDATİF STRES
ve NÖROTOKSİSİTE POTANSİYELİ**

Demet USTA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 05.10.2004 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza:... *Elif Oruç*...

Yrd.Doç.Dr. Elif ORUÇ
JÜRİ BAŞKANI

İmza:... *Nevin Üner*...

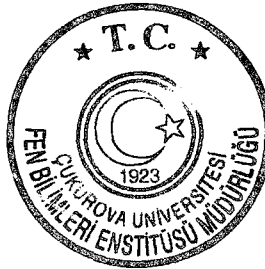
Prof.Dr. Nevin ÜNER
ÜYE

İmza:... *Lülüfer Tamer*...

Doç.Dr. Lülüfer TAMER
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No: 2285



Fikri Akdeniz
Prof. Dr. Fikri AKDENİZ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FEF2003YL6

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

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİAZİNONUN *Cyprinus carpio* DOKULARINDA OKSİDATİF STRES ve NÖROTOKSİSİTE POTANSİYELİ

Demet USTA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Elif ORUÇ

Yıl: 2003, Sayfa: 99

Jüri: Yrd.Doç.Dr. Elif ORUÇ

: Prof.Dr. Nevin ÜNER

: Doç. Dr. Lülüfer TAMER

Diazinon etkisinde 5, 15 ve 30 gün süre ile bırakılan ergin *Cyprinus carpio*'da oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna karşı doku spesifik savunmaları karşılaştırılmıştır. Diazinonun nörotoksisite potansiyelini ve iyon iletimine olan etkilerini belirlemek üzere uygulamadan sonra farklı dokularda asetilkolinesteraz ve sodyum potasyum adenoazin trifosfataz spesifik aktiviteleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Diazinonun çevredeki düzeyleri ve *C. carpio*'da letal derişimi esas alınarak 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb derişimler seçilmiştir.

Diazinon uygulaması solungaç ve kas dokularında nörotoksisiteye neden olmuştur ancak sindirim sistemi ve böbrek dokusunda değişim bulunmamıştır. Kas ve böbrek dokularında sodyum potasyum adenoazin trifosfataz aktivitesinde önemli bir azalma kaydedilirken solungaç dokusunda dalgalanma görülmüştür. Süperoksit dismutaz aktivitesi diazinon toksisitesine bağlı olarak oksidatif strese karşı sindirim sistemi dışındaki tüm dokularda artmıştır. Glutasyon peroksidaz aktivitesi sindirim sistemi ve böbrek dokusunda değişmezken solungaç ve kas dokularında aktivite artmıştır. Katalaz aktivitesi sindirim sistemi ve kas dokusunda azalırken, solungaç ve böbrek dokularında önemli bir değişim olmamıştır. Malondialdehit miktarı diazinon uygulamasına yanıt olarak azalan ve artan değişimlerin kaydedildiği böbrek dokusu dışındaki tüm dokularda artmıştır. Protein miktarı sadece böbrek dokusunda 5 gün uygulama sonunda derişime bağlı olarak azalmıştır.

Bu çalışmanın bulgularına göre diazinonun subletal derişimleri *C. carpio*'da oksidatif strese ve nörotoksisiteye neden olabilir ve dokuya özgü yanıtları doza bağlı olarak indükleyebilir. Ayrıca superoksit dismutaz aktivitesinin diazinon toksisitesinde biyoindikatör olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Diazinon, *C. carpio*, oksidatif stres, AChE, Na⁺K⁺-ATPaz

ABSTRACT

MSc THESIS

THE OXIDATIVE STRESS and NEUROTOXICITY POTENTIAL of DIAZINON in the TISSUES of *Cyprinus carpio*

Demet USTA

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Elif ORUÇ

Year: 2003, Page: 99

Jury: Assist.Prof.Dr. Elif ORUÇ

: Prof.Dr. Nevin ÜNER

: Assoc.Prof.Dr. Lülüfer TAMER

Tissue-specific defenses against the possibility of oxidative stress and lipid peroxidation were compared in adult fish, *Cyprinus carpio* exposed to diazinon for 5, 15 and 30 days. We also examined the alterations of acetylcholinesterase and sodium potassium adenosine triphosphatase specific activities in order to evaluate the neurotoxic potential of diazinon and its effect on ion transmission in the different tissues of fish after diazinon exposure, by using spectrophotometric methods. 0.0036 ppb, 0.018 ppb and 0.036 ppb were chosen as experimental concentrations based on the environmental levels and lethal concentration of pesticide in *C. carpio*.

Diazinon exposure caused the neurotoxicity in gill and muscle tissues, however no changes observed in gastrointestinal tract and kidney tissue. A significant decline was recorded in sodium potassium adenosine triphosphatase activity in muscle and kidney tissues while fluctuation was shown in gill. Superoxide dismutase activity increased against to oxidative stress depending on diazinon toxicity in all tissues with the exception of gastrointestinal tract. There is no significant changes in glutathione peroxidase activity in gastrointestinal tract and kidney tissue while the activity tends to increase in gill and muscle tissues. Catalase activity decreased in gastrointestinal tract and muscle tissues whereas no significant alteration was observed in gill and kidney tissues. Malondialdehyde content increased in response to diazinon treatment in all tissues except for kidney in which decreasing and increasing trends were recorded. Protein content declined in a concentration-dependent manner only in gill for 5 days.

According to the findings of the present study, sublethal diazinon concentrations may cause oxidative stress and neurotoxicity, and induce tissue specific response in *C. carpio* dose dependently. Furthermore, superoxide dismutase may be used as a bioindicator of diazinon toxicity.

Key words: Diazinon, *C. carpio*, oxidative stress, AChE, Na^+K^+ -ATPase

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince destek olan başta danışmanım Yrd.Doç.Dr. Elif Oruç'a, Prof.Dr. Nevin Üner ve Arş.Gör. Yusuf Sevgiler'e teşekkür ederim.

Araştırmalarımnda maddi ve manevi desteklerini gördüğüm Uzman Biyolog Muhittin Doğan'a ve Biyolog Hülya Durmaz'a sonsuz teşekkür ederim.

Tüm aile bireylerime, özellikle anneme, her şey için teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Türler.....	6
1.2. Biyoindikatörler.....	10
1.2.1. Antioksidan Enzimler.....	13
1.2.1.1. Süperoksit Dismutaz.....	15
1.2.1.2. Katalaz.....	18
1.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz.....	19
1.2.2. Asetilkolinesteraz.....	20
1.2.3. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz.....	24
1.2.3.1. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfatazın Yapısı... 25	
1.2.3.2. Hücre Hacminin Kontrolünde Na ⁺ K ⁺ Pompasının Önemi.....	27
1.2.3.3. Sodyum, Potasyum Adenozin Trifosfataz Etkinliğinin Düzenlenmesi.....	28
1.2.4. Lipid Peroksidasyonu.....	29
1.2.4.1. Metal Aracılıklı Peroksidasyon.....	32
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	34
3. MATERYAL ve METOD.....	42

3.1. Materyal.....	42
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
3.1.2. Kullanılan Aletler.....	43
3.1.3. Deney Materyali.....	43
3.2. Metod.....	44
3.2.1. Analiz Yöntemleri.....	45
3.2.1.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi.....	45
3.2.1.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Yöntemi...	46
3.2.1.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi.....	48
3.2.1.4. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi.....	49
3.2.1.5. Katalaz Yöntemi.....	51
3.2.1.6. Malondialdehit Yöntemi.....	52
3.2.1.7. Protein Yöntemi.....	54
3.2.2. İstatistiksel Analiz.....	55
4. BULGULAR.....	56
4.1. Solungaç Dokusu.....	55
4.1.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri.....	56
4.1.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Aktivitesine Etkileri.....	56
4.1.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri.....	59
4.1.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri.....	59
4.1.5. Katalaz Aktivitesine Etkileri.....	62
4.1.6. Malondialdehit Miktarına Etkileri.....	62

4.1.7. Protein Miktarına Etkileri.....	65
4.2. Sindirim Sistemi.....	67
4.2.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri.....	67
4.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri.....	67
4.2.3. Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz Enzim Aktiviteleri ile Malondialdehit Miktarına Etkileri.....	67
4.2.4. Protein Miktarına Etkileri.....	68
4.3. Kas Dokusu.....	69
4.3.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri.....	69
4.3.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfaz Aktivitesine Etkileri.....	69
4.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri.....	70
4.3.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri.....	70
4.3.5. Katalaz Aktivitesine Etkileri.....	71
4.3.6. Malondialdehit Miktarına Etkileri.....	71
4.3.7. Protein Miktarına Etkileri.....	72
4.4. Böbrek Dokusu.....	72
4.4.1. Asetilkolinesteraz ve Katalaz Aktiviteleri ile Protein Miktarına Etkileri.....	72
4.4.2. Sodyum, Potasyum Adenozin Trifosfaz Aktivitesine Etkileri.....	73
4.4.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri.....	74
4.4.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri.....	74
4.4.5. Malondialdehit Miktarına Etkileri.....	75
5. TARTIŞMA.....	76

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	83
KAYNAKLAR.....	84
ÖZGEÇMİŞ.....	99



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi.....	45
Çizelge 3.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Yöntemi.....	47
Çizelge 3.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi.....	48
Çizelge 3.4. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi.....	50
Çizelge 3.5. Katalaz Yöntemi.....	51
Çizelge 3.6. Malondialdehit Standart Eğri Çizimi.....	53
Çizelge 3.7. Malondialdehit Yöntemi.....	53
Çizelge 3.8. Protein Standart Eğrisinin Çizimi.....	55
Çizelge 3.9. Protein Yöntemi.....	55
Çizelge 4.1. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda AChE aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	56
Çizelge 4.2. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda Na ⁺ K ⁺ -ATPaz (µmol/mg protein/saat) aktivitesine etkisi.....	59
Çizelge 4.3. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda SOD (U/mg protein) aktivitesine etkisi.....	59
Çizelge 4.4. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	62
Çizelge 4.5. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	62
Çizelge 4.6. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi.....	65
Çizelge 4.7. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da solungaç dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi.....	65
Çizelge 4.8. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde AChE aktivitesine (U/ mg protein) etkisi.....	67
Çizelge 4.9. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	67
Çizelge 4.10. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	68

Çizelge 4.11. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	68
Çizelge 4.12. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi.....	68
Çizelge 4.13. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da sindirim sisteminde protein miktarına (mg/mL) etkisi.....	69
Çizelge 4.14. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda AChE aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	69
Çizelge 4.15. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda Na ⁺ K ⁺ -ATPaz aktivitesine (µmo/ mg protein/saat) etkisi.....	70
Çizelge 4.16. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	70
Çizelge 4.17. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	71
Çizelge 4.18. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	71
Çizelge 4.19. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi.....	72
Çizelge 4.20. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da kas dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi.....	72
Çizelge 4.21. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda AChE aktivitesine (U/ mg protein) etkisi.....	73
Çizelge 4.22. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda CAT aktivitesine (U/ mg protein) etkisi.....	73
Çizelge 4.23. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi.....	73
Çizelge 4.24. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda Na ⁺ K ⁺ -ATPaz aktivitesine (µmo/ mg protein/saat) etkisi.....	74
Çizelge 4.25. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	74
Çizelge 4.26. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi.....	74
Çizelge 4.27. Diazinonun <i>C. carpio</i> 'da böbrek dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 1.1. Organofosforlu insektisitlerin kimyasal yapısı.....	2
Şekil 1.2. Diazinonun metabolik yolu.....	5
Şekil 1.3. Serbest radikal hasarı ürünleri.....	7
Şekil 1.4. Reaktif oksijen türler ve antioksidan savunmada yer alan enzimlerin rolleri.....	14
Şekil 1.5. Bakır çinko içeren süperoksit dismutaz molekülü.....	15
Şekil 1.6. Mangan içeren süperoksit dismutaz molekülü.....	16
Şekil 1.7. Demir içeren süperoksit dismutaz molekülü.....	17
Şekil 1.8. Katalaz molekülü.....	18
Şekil 1.9. Glutasyon.....	19
Şekil 1.10. Glutasyon peroksidaz molekülü.....	20
Şekil 1.11. Asetilkolinesteraz molekülü.....	21
Şekil 1.12. Asetilkolinin transesterifikasyonu ve hidroliz ile AChE'nin rejenerasyonu.....	21
Şekil 1.13. Asetilkolinesterazın fosforilasyonu ve asetilkolin birikimi.....	22
Şekil 1.14. Organofosforlu bir bileşik tarafından bir esterazın inhibisyonu 1) Michaelis kompleksinin oluşumu, 2) Enzimin fosforilasyonu, 3) Reaktivasyon reaksiyonu, 4) Eskime.....	23
Şekil 1.15. Sodyum potasyum adenosin trifosfatazın topolojik yapısının üç boyutlu modeli.....	26
Şekil 1.16. Sodyum potasyum adenosin trifosfatazın reaksiyon döngüsü.....	27
Şekil 1.17. Lipid peroksidasyonu kimyası.....	31
Şekil 4.1. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında AChE spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi.....	57
Şekil 4.2. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, kas ve böbrek dokularında Na ⁺ K ⁺ -ATPaz spesifik aktivitesinin (µmol/mg protein/saat) kontrole göre % değişimi.....	58

Şekil 4.3. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında SOD spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi.....	60
Şekil 4.4. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında GPx spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi.....	61
Şekil 4.5. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında CAT spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi.....	63
Şekil 4.6. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında MDA miktarının (nmol/mg protein) kontrole göre % değişimi.....	64
Şekil 4.7. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında protein miktarının (mg/mL) kontrole göre % değişimi.....	66



1. GİRİŞ

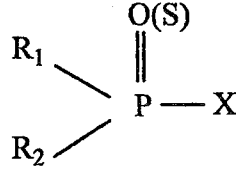
Çevre kirliliği herhangi bir madde ya da enerji formunun (örneğin ısı) çevrenin uyum sağlayabileceğinden daha yüksek bir oranda dispersiyon, yıkılma, geri dönüşüm ya da depolama yolu ile çevreye girmesi olarak tanımlanır. Kirlenmenin artması endüstrileşme, kentleşme ve insan popülasyonundaki artışın bir sonucudur (Hayward ve Trerise, 2001). Endüstriyel ve tarımsal aktivitelerdeki artış toprak ve suyun toksik organik kirleticiler ile kontaminasyonuna neden olmuştur. Bu olay hem çevre hem de canlılar açısından tehlikeli bir durum oluşturmaktadır (Torres ve ark., Baskıda).

Ksenobiyotikler ile giderek artan çevresel kirlenme akuatik ortamlarda ciddi sorunlara neden olmaktadır. Su kirliliği deniz, göl, dere ve yer altı sularında bu bileşiklerin birikimi sonucu oluşur. Bu durum yaşamı ya doğrudan etkiler ya da sekonder uzun süreli zararlı etkilere neden olur (Hayward ve Trerise, 2001). Ksenobiyotikler yoğun kullanım, havadan ilaçlama ya da uygulama sonrası süzülme ya da kaza eseri meydana gelen salınım ile akuatik ortamlara girer ve yayılırlar. Ksenobiyotikler ile yakın temas ve onların reaktivitesi akuatik organizmalarda sadece onların değil aynı zamanda insan için de tehlike oluşturacak biyoakümüülasyon ile sonuçlanır (Zelikoff, 1994).

Pestisitler böcekler, zararlı otlar ve nematodlar gibi istenmeyen organizmaları engellemek, yok etmek, uzaklaştırmak ya da kaçırmak amacı ile kullanılan, etki tarzları, doğadaki kalıcılıkları ve parçalanma yolları birbirinden farklı fiziksel, kimyasal ya da biyolojik ajanlar olarak tanımlanabilirler. Ancak, pestisitler hedef organizma dışındaki canlılara da toksik etkili olabilirler. Fonksiyonlarına göre farklı sınıflara ayrılabilirler. Örneğin; etki ettikleri canlı grubuna göre insektisitler, herbisitler, fungusitler ve nematositler ve rodentisitler olarak sınıflandırılabilirler. Bu pestisit sınıfları kimyasal yapılarına göre organoklorlular, karbamatlar, organofosfatlar ve piretiroidler olarak gruplandırılırlar (DFID NRSP Project R7668, 2002).

Organofosforlu insektisitler İkinci Dünya Savaş'ı sırasında kimyasal savunma ajanları ve insektisit olarak geliştirilmişlerdir (Hathway, 2000). Organofosforlu insektisitler fosforik, fosfonik, fosforotioik ya da fosfonotioik asitlerin ester, amid ya

da tiyol türevleridirler. Organofosforlu insektisitlerin temel kimyasal yapıları Şekil 1.1.'de verilmiştir .



Şekil 1.1. Organofosforlu insektisitlerin kimyasal yapısı (Sogorb ve Vilanova, 2002).

R_1 ve R_2 genelde aril ya da alkil gruplarıdır. Fosfor atomuna doğrudan (fosfinatlar) ya da bir oksijen veya bir kükürt atomu ile (fosfatlar ya da fosfatiyoatlar) bağlıdır. Diğer durumlarda R_1 fosfor atomuna doğrudan bağlıdır ve R_2 ile oksijen ya da kükürt atomuna bağlıdır (fosfonatlar veya tiyofosfonatlar). -X grup halojen, alifatik, aromatik ya da heterosiklik gruplara ait olabilir. Fosfor atomuna bir oksijen ya da kükürt atomu ile bağlı -X grubu “ayrılan grup” olarak adlandırılır. Çünkü organofosforlu bileşik fosfotriesterazlar ile ya da protein hedefler ile etkileşim sonucunda hidroliz edildiğinde bu grup ayrılır (Sogorb ve Vilanova, 2002). Çevrede kısa süreli kalıcılıkları nedeni ile organofosforlu bileşikler dünya genelinde yaygın olarak kullanılan insektisit grubu haline gelmiştir. Çevrede hızlı parçalanmalarına karşın, genellikle hedef seçicilikleri yoktur ve hedef olmayan omurgalı ve omurgasız canlılara karşı yüksek akut toksisite gösterirler (Fulton ve Key, 2001).

Diazinon (O, O- diethyl O-[6-methyl-2-(1-methylethyl) – 4- pyrimidinyl] phosphorothioate) geniş aktiviteye sahip kontakt etkili organofosforlu bir insektisittir. Böcek, akar ve örümceklerin ergin ve genç formlarına karşı etkilidir. 1950’li yılların başından beri kullanılmaktadır. Başlıca formülasyonları ıslanabilir toz ve emülsifiye olabilir derişimlerdir. Diazinonun ticari isimleri Knox-out, Dianon ve Basudin’dir. Diazinonun çevresel düzeyleri genelde düşüktür. Solunum ya da besinle de alınabilir. Su yolu ile alınımı önemsiz düzeydedir.

Diazinon kullanımı iki ana gruba ayrılır; tarımda pestisit olarak ve veterinerlikte ilaç olarak. Yenilebilir ürünlerde diazinon rezidülerinin ana kaynağı pestisit olarak kullanımından, et, sakatat ve diğer hayvansal ürünlerdeki rezidüler aktif madde içeren veterinerlik ilaçlarının kullanımından kaynaklanır.

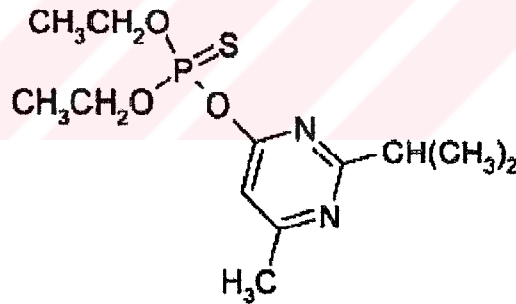
Diazinonun kimyasal ve biyolojik parçalanmasının hızlı olması nedeniyle toprakta kalıcılığı fazla değildir. Toprağın tipine, mikroorganizmaların aktivitelerine, su içeriğine ve pestisit konsantrasyonuna bağlı olarak diazinonun topraktaki yarı ömrü 21-80 gün arasında değişir. Toprakta diazinonun hareketi özellikle organik madde ve kalsiyum karbonat miktarı olmak üzere bir çok faktör tarafından etkilenir. Oktonal adsorpsiyon katsayısının (K_{oc}) 500 olmasından dolayı toprağa kuvvetli şekilde bağlandığı düşünülür ve toprakta orta derecede hareketlilik gösterir.

Doğal sularda diazinonun yarı ömrü 5-15 gündür. Diazinonun parçalanmasında kimyasal ve biyolojik işlemler bir arada rol oynayarak birkaç hafta içinde mineralize olmasına neden olurlar.

Akuatik organizmalar tarafından diazinonun alınımı hızlıdır. Hızlı metabolizması ve eliminasyonu ile akuatik canlılarda biyokonsantrasyon faktörü düşüktür.

Kimyasal Adı : Diazinon

Kimyasal Yapı



Kimyasal Formül : $C_{12}H_{21}N_2O_3PS$

Moleküler Ağırlık : 304.35

Başlıca Kullanımı : İnsektisit

İkincil Kullanımı : Ektoparazitsit

Kimyasal Grup : Organofosforlu bileşik

IUPAC Kimyasal İsim: *O,O*-diethyl *O*-2-isopropyl-6-methyl-pyrimidin-4-yl phosphorothioate

CAS Kimyasal İsim: *O,O*-diethyl *O*-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pirimidiny] phosphorothioate

Yoğunluk	: 20 °C'de 1.11 g/cm ³
Kaynama Noktası	: 26.6 mPa'da 83-84°C ; 133 mPa'da 125°C
Buhar basıncı	: 20°C'de 9.7 mPa
Spesifik gravite	: 20°C'de 1.116-1.118
Stabilite	: 100°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda oksidasyona duyarlı; nötral ortamlarda stabil, alkali ortamlarda yavaş, asidik ortamlarda daha hızlı hidroliz olur.
Parçalanma	: >120°C
Korozivite	: Non-korozif
Çözünürlük	: 20 °C'de suda 60 mg/L; eter, aseton, alkol, benzen, toluen, sikloheksan, hekzan, diklorometan gibi yaygın organik çözücüler ile tamamen karıştırılabilir.

Diazinon gastrointestinal sistemden, deriden ve solunum ile alınabilir. İnsanlarda transdermal absorpsiyonu düşüktür. Diazinon mikrozomal enzimlerce kolinesteraz inhibitörü olan diazokson, hidroksidiazokson ve hidroksidiazinon metabolitlere oksitlenir. Süt ve yumurtada metabolitleri düşük miktarda belirlenmiştir. Diazinon ve metabolitleri vücut dokularında belirlenmiştir. Oral yolla alınan diazinonun %59-95'i 24 saat içinde, %95-98'i 7 günde başlıca türe ile dışarı atılır.

Diazinonun metabolik parçalanma yolu (Şekil 1.2.);

- Ester bağının parçalanması ile hidroksipirimidin türevlerinin oluşumu,
- P-S kısmının P-O türevlerine transformasyonu,
- İzopropil bileşenin oksidasyonu ile primer ve tersiyer alkol türevlerinin oluşumu,
- Metil bileşenin oksidasyonu ile alkol oluşumu,
- Ester bağının glutatyon-aracılıklı parçalanması ile glutatyon konjugatının oluşumu (WHO, 1998).

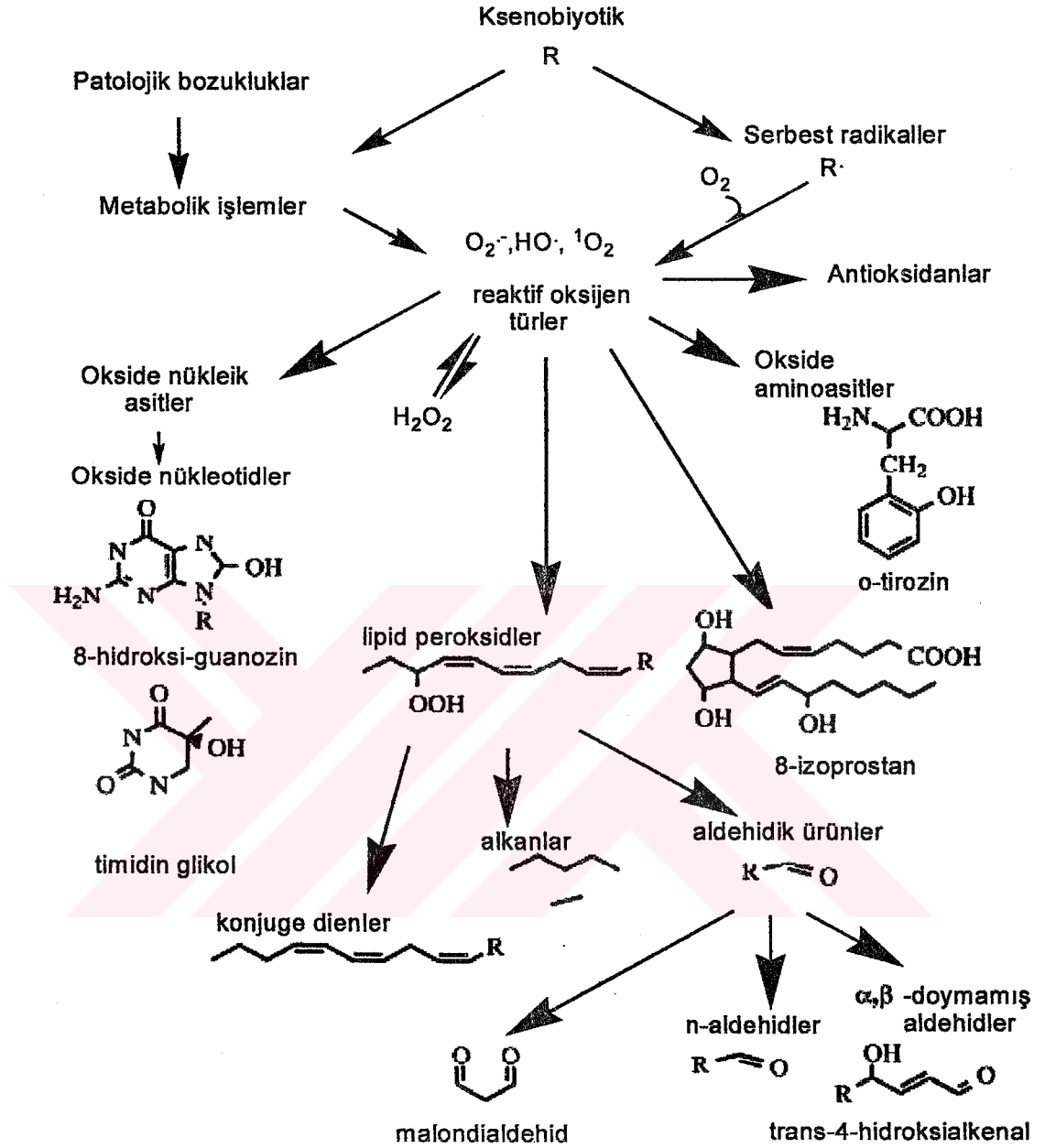
Toksikolojik değerlendirmeler sonucunda diazinonun canlılar için toksik olduğu bulunmuştur. Diazinon etkisinde meydana gelen toksisite, diazinonun biyolojik olarak aktif okson metabolite dönüşümünü sağlayan aktivasyon işlemidir. Bu metabolik aktivasyon işlemi başlıca karaciğerde meydana gelir ve oral alınımdan sonra 30-60 dakika sürer. Diazinonun ve onun biyolojik olarak aktif okson metabolitin nispeten inaktif metabolitlere biyotransformasyonu başlıca karaciğerde meydana gelir. Bu metabolitlerin çoğu böbrekler yoluyla vücuttan alınıp üre ile dışarı çıkartılır. Diazinon P-O aril bağının ayrılması ve izopropil bileşenin oksidasyonu ile inaktive edilir. Metabolitlerin büyük çoğunluğu üriner ekskresyon amacı ile sülfat ya da glukronid ile konjuge edilir (National Registration Authority, 2002).

1.1. Oksidatif Stres ve Reaktif Türler

Reaktif oksijen türler normal metabolik işlemler boyunca sürekli olarak üretilir ve çeşitli koruyucu mekanizmalar ile detoksifiye edilirler. Oksijen aktivasyonu ile reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu arasındaki denge aktivasyon yönünde kaydığında oksidatif stres meydana gelir (Levi ve Hodgson, 2001).

Oksijen metabolizması serbest radikal olarak adlandırılan aktif ara bileşiklerin oluşumuna neden olur. Serbest radikaller eşleşmemiş bir elektrona sahip olan organik ya da inorganik reaktif kimyasal türlerdir. Bir kez oluştuklarında DNA, protein gibi endojen moleküller ile çok sayıda farklı türden reaksiyona katılabilirler. Serbest radikaller;

- a) Hücrelerin iyonize edici radyasyon etkisinde kalması,
- b) Oksijenin metal katyonlar ve organik bileşikler ile enzimatik olmayan reaksiyonları,
- c) Solunum zincirinde elektron transportunda, fagositoziste ve sitokrom P₄₅₀ sistemin aktivitesinde yer alan enzimatik reaksiyonlar sonucunda oluşurlar (Viarengo ve ark., 1991).

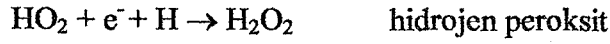
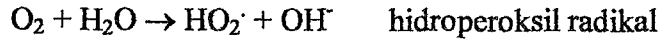


Şekil 1.3. Serbest radikal hasarı ürünleri (de Zwart ve ark., 1999).

Doymamış yağ asitleri ile reaksiyonları sonucunda alkoksil radikal ($RO\cdot$), peroksi radikal ($ROO\cdot$) ve organik hidroperoksitler ($ROOH$) gibi diğer reaktif oksijen türleri oluşur. Bu olay lipid peroksidasyonuna ve membran hasarına neden olur. Proteinler ile reaksiyonları enzim hasarına, DNA ile reaksiyonu ise baz modifikasyonlarına ya da iplik kırıklarına neden olur ki bu durum mutajenite ve karsinojenite ile sonuçlanır (Şekil 1.3.). Reaktif metabolitler nükleik asit, kofaktör,

lipid ve polisakkaritlere kovalent olarak bağlanabilirler ve onların biyolojik özelliklerini değiştirirler. Sonuç olarak çok sayıda etki meydana gelebilir ve bunların arasında enerji üretiminin kaybı, membran permeabilitesinin değişmesi ve makromoleküllerin sentezinin azalması bulunmaktadır (Livingstone, 1991).

Moleküler oksijenin (O_2) temel metabolizmasında dört elektron alınımı ile tamamen H_2O 'ya redüksiyon yer alır. Ancak aşağıda gösterildiği gibi bir elektron redüksiyonu yolu ile serbest radikaller ve H_2O_2 meydana gelebilir;



Moleküler oksijene bir elektron transferi ile $O_2^{\cdot -}$ radikal oluşur. Sulu, nötral pH solüsyonlarda $O_2^{\cdot -}$ 'nin kimyasal reaktivitesi başlıca üç tip reaksiyonu içerir;

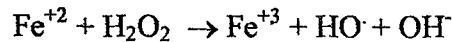
1. Süperoksit radikal zayıf bir baz gibi proton alarak hidroperoksil radikali ($HO_2^{\cdot}$) oluşturur. Bu reaksiyonu H_2O_2 'ye dismutasyon reaksiyonu takip eder.

$$O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow HO_2^{\cdot}$$

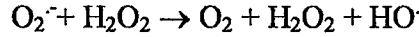
$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
2. Süperoksit radikal, Fe^{+3} ve Cu^{+2} gibi okside geçiş metal kompleksleri, ferrisitokrom c ve kinonlar gibi elektron akseptörleri için bir elektron indirgeyici gibi davranır.
3. Süperoksit radikal askorbat gibi asidik protonlar taşıyan moleküller için bir elektron oksidan gibi davranır.

Süperoksit radikal, H_2O_2 ve $HO^{\cdot}$ gibi diğer reaktif türlerin oluşumuna neden olur. Hidroksil radikal biyolojik sistemlerdeki en kuvvetli oksidan olarak düşünülür. Çeşitli moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir.

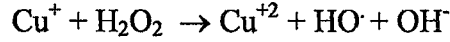
Hidroksil radikal Fenton reaksiyonu yolu ile H_2O_2 'nin parçalanmasından meydana gelir;



Haber-Weiss reaksiyonu yolu ile $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 'nin etkileşiminden meydana gelir;



Bakır gibi redükte geçiş metal formlarının H_2O_2 ile etkileşimi sonucu oluşur;



Hidroksil radikal hidrofobik ve hidrofilik hücrel mikro çevrelerde çok sayıda biyolojik bileşik ile reaksiyona giren aşırı derece reaktif ve stabil olmayan oksitleyici bir türdür. Hidroksil radikal, hidrojen ayrılması ve elektron transfer reaksiyonlarına katılır. Süperoksit radikal ve H_2O_2 'nin aksine, hiçbir enzim sistemi direkt olarak $HO^{\cdot}$ reaktivitesini düzenleyemez. Hücrel temizleyici mekanizmaların amacı $HO^{\cdot}$ oluşumunu engellemektir (Del Maestro, 1980).

Hidrojen peroksitin kendisi çeşitli organik molekülleri oksitlemeye yetecek düzeyde reaktif değildir. Ancak, daha önce belirtildiği gibi oldukça yüksek reaktiviteye sahip $HO^{\cdot}$ 'yu üretme yeteneğinden dolayı biyolojik olarak önemli bir oksidandır (Yu, 1994).

Hidrojen peroksit iki tip reaksiyon ile oluşur:

1. Ürat-, D-amino asit ve ksantin oksidaz gibi enzimler ile O_2 'nin divalent redüksiyonu,
2. Süperoksit radikalın kendiliğinden ya da enzim katalizli dismutasyonu.

Hidrojen peroksit oluşumu ile sonuçlanan divalent enzimlerin çoğu peroksisomlarda lokalize olur. Süperoksit radikalın intrasellüler kaynakları H_2O_2 üretimine neden olsa da mitokondri asıl H_2O_2 üretim kaynağıdır. Eşleşmemiş elektronu olmadığından radikal değildir ve orta düzeyde kimyasal reaktivite gösterir. Hidrojen peroksitin iki özelliği onun kimyasal reaktivitesinin artmasına neden olur;

- a) Hidrojen peroksit biyolojik membranları kolayca geçebilir,
- b) Hidroksil radikal ve oksoferril kompleksler ($Fe^{+4}=O$) gibi daha güçlü oksidanların oluşumu için gereklidir.

Çeşitli hücre tiplerinde üretilen nitrik oksid ($NO^{\cdot}$) vasküler endotelyumda iyi araştırılmıştır. Çok fazla reaktif olmamasına karşın (zayıf oksitleyici fonksiyon) $O_2^{\cdot-}$ ile kolayca reaksiyona girer ve aşırı derecede reaktif olan peroksinitriti ($ONOO^{\cdot}$) oluşturur.

Triplet molekülden moleküler oksijene uyarılma enerjisinin transferi ile elektronik olarak uyarılmış singlet oksijen (1O_2) oluşur, eşleşmemiş elektrona sahip

değildir. Başlıca elektronca zengin moleküller ile reaksiyona girer. Biyomoleküller üzerinde zararlı etkileri vardır, genotoksik ve sitotoksik etkilere neden olur. Ayrıca, sinyal transdüksiyon yollarında ve karsinogeneziste rol alır.

Aerobik ortamda bir organizmanın hayatta kalması için serbest radikal türlerin biyolojik üretimi ile organizmanın bu reaktif türleri kontrol etme kapasitesi arasında karmaşık bir etkileşim vardır (Del Maestro, 1980). Aerobik yaşamın bir sonucu olarak, canlılar metabolizmanın yan ürünü olarak sürekli olarak üretilen reaktif oksijen türleri (O_2^- , H_2O_2 , $HO^\cdot$) ile mücadele etmek ve hücrel makromolekülleri onların verdiği hasardan korumak durumundadırlar (Storey, 1996).

Serbest oksijen radikaller tüm aerobik dokularda devamlı olarak üretilirler. Ksenobiyotiklerin çoğu reaktif oksijen türlerin oluşumu yolu ile toksik etki gösterirler (Lackner, 1998). Serbest radikaller pestisitlerin ve çevresel kimyasalların toksisitesinde önemli rol oynarlar (Banerjee ve ark., 1999).

1.2. Biyoindikatörler

Son yıllarda biyoindikatör kavramı çevre bilimlerinde çok önemli bir yere sahiptir. Bu terim doğal ya da çevreden kaynaklanan stres sonucunda organizmada gözlenen biyolojik değişimler ile ilgilidir (Zelikoff ve ark., 2000).

Moleküler ya da hücrel düzeylerde ölçülen biyolojik indikatörler ya da biyoindikatörler çevresel kalite değerlendirmesinde biyolojik etkinin belirlenmesinde duyarlı bir “erken uyarı” olarak kullanılmaktadır. Seçilen biyoindikatör organizmanın kirleticilerin etkisinde kaldığını veya organizmanın kirletici ajana yanıtının boyutunu göstermelidir (Cajaraville ve ark., 2000).

Biyoindikatörler spesifikliklerine göre iki diziye ayrılırlar. Dizi 1 biyoindikatörler; spesifik kirleticilere yanıt verirler ve genellikle enzim inhibisyonunu içerirler. Dizi 2 biyoindikatörler; genel subletal strese yanıt verirler ve genellikle enzim indüksiyonunu içerirler. Organofosforlu ve karbamatlı pestisitlerin etkisinde asetilkolinesteraz aktivitesinin, kurşun toksisitesinde gama-aminolevulinik asit dehidrataz aktivitesinin inhibisyonu ve ağır metal etkisinde metallotionein düzeyi Dizi 1 biyoindikatörler içinde yer alır. Stres yanıtlayan proteinler, lipid

peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehid (MDA), askorbik asit ve hormon düzeylerindeki değişimler Dizi 2 biyoindikatörler içinde yer alırlar. Ksenobiyotik metabolizmasında yer alan sistemler biyoindikatörlerin özel bir alt grubunu oluşturur. Kirleticilere yanıt olarak spesifik olarak indüklendikleri ancak bireysel kirleticiler açısından nispeten non-spesifik olmaları nedeni ile Dizi 1 ile Dizi 2 biyoindikatörler arasında özel bir yerde yer alırlar (Rees, 1993).

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), katalaz (CAT, EC 1.11.1.6) ve glutatyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9) gibi hücrel antioksidan sisteme ait olan enzimler reaktif oksijen türlerinin toksisitelerine karşı koyarlar. Dolayısı ile antioksidan enzimler hücre homeostazisinin korunmasında önemli rol oynarlar. Kimyasal stres altında antioksidan enzimlerin aktiviteleri indüklenebilir ya da inhibe olabilir. Bu iki tip yanıt birbirine zıt değildir ve bir yandan uygulanan stresin yoğunluğuna ve süreye, diğer yandan etkide kalan canlının duyarlılığına bağlıdır. İndüksiyon canlının ortama ve toksisiteyi engellemeye adaptasyonu olarak düşünülür. İnhibisyon strese karşı yüksek duyarlılık ile karakterize edilen tehlikeli durumu gösterir ve olumsuz etkilere neden olabilir. Dolayısı ile antioksidanlar sadece ksenobiyotiklerin etkisinde kalmayı değil aynı zamanda toksisiteyi de yansıtan kullanışlı indikatörlerdir (Doyotte ve ark., 1997; Cossu ve ark., 2000).

Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) aktivitesinin inhibe olması organofosfat ya da karbamatların etkisinde kalmanın bir göstergesidir. Asetilkolinesteraz organofosforlu insektisitlerin başlıca toksisite mekanizmasıdır. Bu nedenle biyoindikatör etki bileşiğin toksik etki mekanizması ile doğrudan ilişkilidir. Asetilkolinesteraz aktivitesinde önemli bir inhibisyon belirlendiğinde organizmanın sadece bileşiğe maruz kaldığı değil aynı zamanda fizyolojik etkiler oluşturmak üzere yeterli dozda bileşiğin hedef bölgeye ulaştığı anlaşılır. Ayrıca daha önce bahsedildiği gibi organofosforlu insektisitler doğada hızlı şekilde parçalanırlar ve çevresel örneklerdeki konsantrasyonları saatler içinde belirlenebilir düzeyin altına düşebilir. Ancak çoğu türde AChE inhibisyonu daha uzun süre devam eder (Fulton ve Key, 2001).

Reaktif oksijen türler a) Membran fosfolipidleri b) Membran proteinleri c) İyon transport mekanizmalarının düzenleyicilerini hedefleyerek iyon transport

mekanizmaları üzerindeki etkilerini gösterirler (Kourie, 1998). Sodyum, potasyum adenosin trifosfor (Na⁺K⁺-ATPaz, EC 3.6.1.37), reaktif oksijen türlerin hedeflerinden biridir, doğrudan oksidatif stres içinde yer alır ve toksisitenin önemli indikatörlerinden biridir (Dobrota ve ark., 1999; Yadwad ve ark., 1990).

Oksidatif stres sırasında meydana gelen tipik reaksiyonlardan biri doymamış yağ asitlerinde peroksidatif hasar olduğundan lipid peroksidasyonu kimyasal kirleticiler tarafından indüklenen oksidatif stres etkilerine karşı indikatör olarak kullanılabilir (Pandey ve ark., 2003).

Akuatik ortamlar akuatik canlılarda oksidatif stres oluşturma potansiyeline sahip çoğu çevresel kirleticiyi içermektedir. Memeliler ile benzer olarak, balık dokularında reaktif oksijen türler devamlı olarak üretilirler. Balıklar ile yapılan çalışmalar memeliler ile balıkların oksidatif strese karşı benzer toksikolojik ve adaptif yanıtlar verdiklerini göstermektedir (Kelly ve ark., 1998). Ayrıca balıklar besin zincirinde önemli rol oynarlar ve pestisitlerin balıklar üzerindeki etkilerinin araştırılması, bu maddelerin insan sağlığına olan olumsuz etkilerinin değerlendirilmesinde tanımlayıcı bir öneme sahiptir (Begum ve Vijayaraghavan, 1996).

Solungaç dokusu suda çözünmüş ksenobiyotikler ile karşılaşan ilk organdır. Ayrıca solungaçlar ters kan/su akım sistemine, çok ince epitel membranlara ve büyük yüzey alanına sahiplerdir. Bu özelliklerin tamamı maddelerin sudan alınımı ve kana taşınmalarını kolaylaştırır. Diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da, böbrek ksenobiyotiklerin eliminasyonunda temel yoldur. Ayrıca biyotransformasyonda da önemli bir organdır; çünkü çevresel şartlarda ksenobiyotiklerin alınımı solungaçlar yoluyla gerçekleşir, sonrasında organik moleküller arteriyal kan akımı ile öncelikle böbreğe yönlendirilirler (Riviere ve ark., 1990).

Metabolik atıkların uzaklaştırılmasında ve ekstrasellüler sıvı hacminin, elektrolit kompozisyonunun ve asit-baz dengesinin düzenlenmesinde rol oynaması nedeniyle böbreğin fonksiyonel bütünlüğü tüm vücut homeostazisi için yaşamsal önem taşır. Böbrekte meydana gelen toksik bir durum bu fonksiyonların bir kısmına ya da tamamına zarar verebilir ve tüm vücut homeostazisinde zararlı etkilere neden olabilir. Böbrek ksenobiyotiklerin hedef dokularından biridir. Bu dokunun

ksenobiyotiklerle indüklenen hasara karşı duyarlı olmasının nedenleri vardır; öncelikle, böbrek kardiyak çıkışın %25'ini alır. Bu yüksek kan akımı sistemik dolaşımdaki büyük miktardaki ksenobiyotığın böbreklere ulaşmasından kısmen sorumludur. İkinci olarak, filtrasyon, reabsorbsiyon ve sekresyon fonksiyonlarının bir sonucu olarak böbrek ksenobiyotikleri toksik düzeylerde yoğunlaştırılabilir. Yapısı ve fizyolojisi nedeni ile, böbrek hücreleri diğer dokulara oranla daha fazla ve yüksek derişimde kimyasal etkisinde kalırlar. Ayrıca, çoğu nefrotoksikanın toksik olmamasına karşın böbreğe geldiklerinde renal P₄₅₀ sistem, prostaglandin sentetaz ve ya glutatyon konjugasyonu ile ilgili reaksiyonlar sonucu aktive edilebilirler (Levi ve Hodgson, 2001).

Gastrointestinal sistem toksik maddelerin absorbsiyonunda en önemli yollardan biridir. Çevresel kirleticilerin çoğu besin zincirine girerek gastrointestinal sistemden absorblanırlar. Ayrıca sindirim sistemi lipofilik ksenobiyotiklerin ilk geçiş biyotransformasyonlarında önemli rol oynar (Gadagbui ve James, 2000). Moleküler ağırlıkları 600'ün üzerinde olan bileşiklerin sindirim sisteminden absorbsiyonları zayıftır, ancak sudaki organik ksenobiyotiklerin çoğunun moleküler ağırlığı bu değerin altında olduğundan absorbsiyonlarında sorun olmadığı görüldür (Heath, 1995).

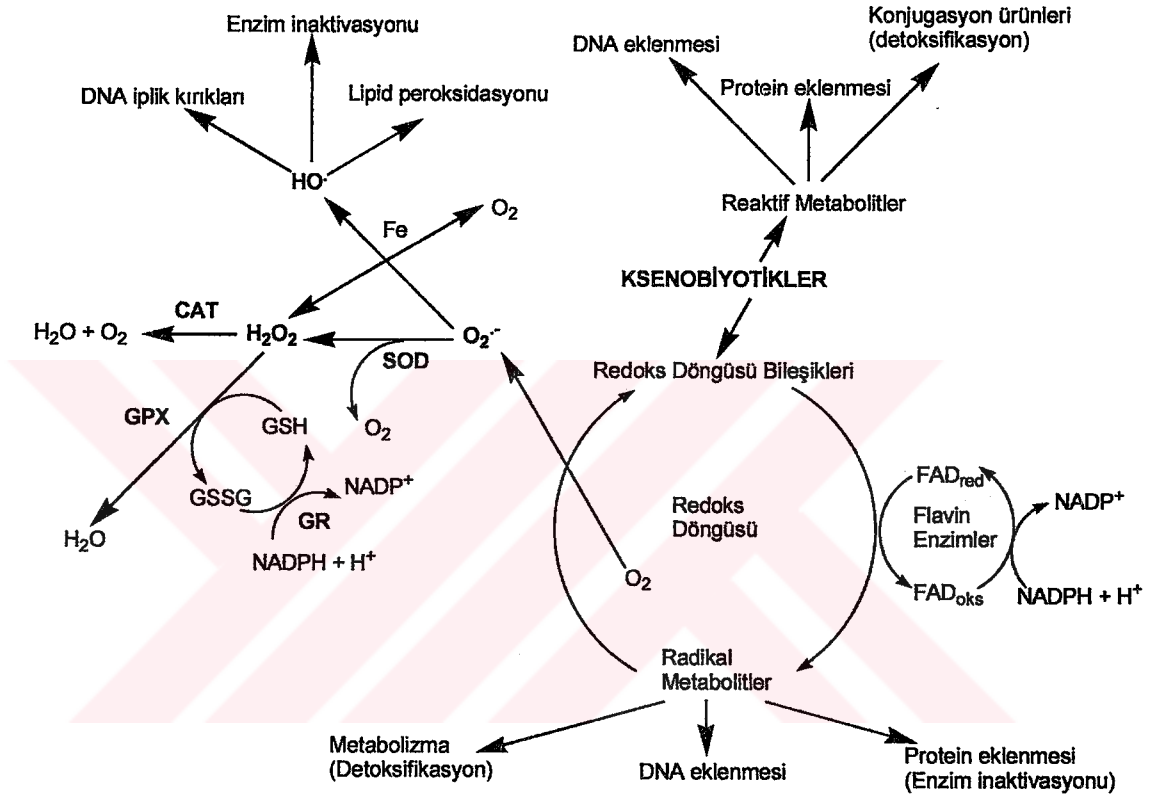
Kas diğer dokulara göre oksijen tüketimi fazla olan bir dokudur. Bu durum reaktif oksijen türlerin yüksek oranlarda üretimine neden olur (Fulle ve ark., Baskıda). Balıklarda kas dokusunun biyolojik olarak analiz edilmesi besin olarak tüketilmesi nedeniyle insan sağlığı açısından çok önemlidir (Begum ve Vijayaraghavan, 1999).

1.2.1. Antioksidan Enzimler

Aerobik canlıların yaşamlarını devam ettirebilmeleri reaktif kimyasal türlerin biyolojik oluşumları ile canlının bu maddeleri kontrol etme yeteneği arasındaki karşılıklı ilişkiye bağlıdır (Del Maestro, 1980). Reaktif oksijen türler ve pro-oksidan türünler spesifik antioksidan enzimleri ve düşük moleküler ağırlıklı suda çözünen (vitamin C, redükte glutatyon (GSH), karetonidler) ve lipidde çözünen (vitamin A ve

E) serbest radikal yakalayıcıları içeren antioksidan savunma sistemi elemanları ile detoksifiye edilir ve kontrol altında tutulurlar (Livingstone, 2001).

Antioksidan sistemi oluşturan enzimler SOD, CAT ve GPx'tir ve koordineli olarak çalışırlar (Şekil 1.4.) (Storey ve ark., 1996).



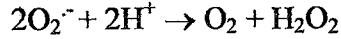
Şekil 1.4. Reaktif oksijen türler ve antioksidan savunmada yer alan enzimlerin rolleri (Inouye ve ark.,1999).

Reaktif oksijen türlerin hasar verici etkileri nedeni ile tüm hücreler antioksidan savunma sistemine sahiplerdir. Korunma üç düzeyde düşünülebilir,

1. Reaktif oksijen türlerin oluşumunun engellenmesi,
2. Radikal yakalayıcılar ya da antioksidan enzimler yolu ile reaktif oksijen türlerin sonlandırılması,
3. Hasarlı hücresel bileşenlerin tamir edilmesi.

1.2.1.1. Süperoksit Dismutaz

Süperoksit dismutaz iki süperoksit anyonun (O_2^-) oksijen ve H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyen bir metalloenzimdir ve hücreleri O_2^- 'nin zararlı etkilerine karşı korumada önemli role sahip olduğu düşünülür;



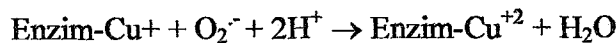
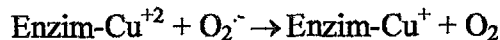
Üç tip SOD vardır, aminoasit dizi homolojilerine karşın iki farklı evrimsel grup gösterirler. Mangan içeren SOD (MnSOD) 86 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik bir proteindir; prokaryotlarda ve ökaryotik mitokondrilerde bulunur. Demir içeren SOD (FeSOD) 41 kDa moleküler ağırlığa sahip bir dimerdir; prokaryotlarda ve birkaç bitki familyasında bulunur. Bakır çinko içeren SOD (CuZnSOD) 32 kDa moleküler ağırlığa sahip dimerik bir proteindir; ökaryotların sitosolünde, bitki kloroplastlarında ve birkaç bakteride bulunur.

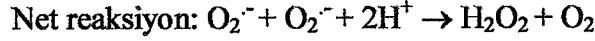


- Zincir A: (153 rezidü)
[K&S: 2 heliks, 9 iplik]
- Cu iyonu
- Zn iyonu

Şekil 1.5. Bakır çinko içeren süperoksit dismutaz molekülü
(<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1fld/tracel.html>)

Tüm CuZnSOD'lar (Şekil 1.5.) için O_2^- 'nin dismutasyon reaksiyonu oldukça hızlıdır. Katalizlenmemiş dismutasyon reaksiyonu için oran sabiti solüsyonun pH'sına bağlıdır ve fizyolojik pH'da yaklaşık $5 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ 'dir. Bakır çinko içeren SOD tarafından katalizlenen reaksiyon ise 5.3-9.5 aralığında pH'dan bağımsızdır ve reaksiyonun oran sabiti yaklaşık $16 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ 'dir. Bakır iyonları dismutasyon reaksiyonunda sırasıyla oksidasyon ve redüksiyon geçirerek fonksiyon görür.





Ancak en azından bir tane farklı etki mekanizması daha vardır. İlk $\text{O}_2^{\cdot -}$, bakır iyonunu indirgemez ancak onunla bir kompleks oluşturur. Çinko iyonları katalitik döngüde fonksiyon görmezler ancak enzimi stabilize ettikleri görülür.



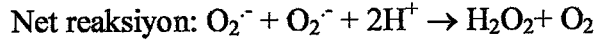
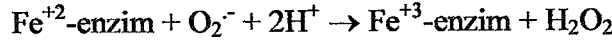
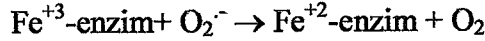
- **Zincir: A** (200 rezidü)
[K&S: 11 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: B** (199 rezidü)
[K&S: 12 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: X** (200 rezidü)
[K&S: 12 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: Y** (200 rezidü)
[K&S: 11 heliks, 3 iplik]

⇒ 4 Mn iyonu

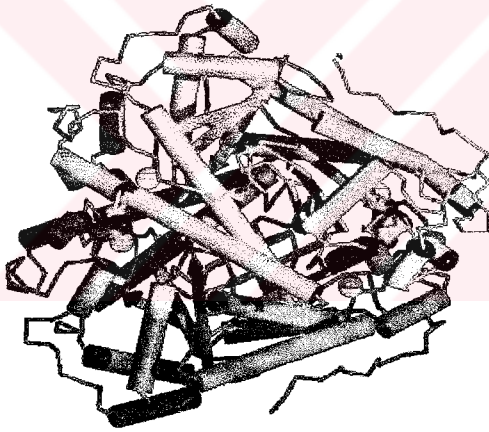
Şekil 1.6. Mangan içeren süperoksit dismutaz molekülü
(<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1kke/tracel.html>)

Mangan içeren SOD'un (Şekil 1.6.) katalizlediği reaksiyon CuZnSOD ile aynıdır. Mangan içeren SOD'ların aminoasit dizileri birbirleri ile ileri derecede benzerdir ve CuZnSOD'lar ile ilişkisi yoktur. Yüksek organizmalardaki MnSOD'ların tamamı dört protein alt birime sahiptir ve her bir alt birim bir Mn iyonu taşır. Çoğu bakteride ise enzimin iki alt birimi vardır. Manganın aktif bölgeden ayrılması katalitik aktivitenin kaybolmasına neden olur ve genelde fonksiyonel enzimi oluşturmak üzere demir gibi diğer metal geçiş iyonları ile yer değiştirmez. Yapılan çalışmalar kataliz olayı sırasında manganın değerlik durumunda değişim geçirdiğini göstermiştir, ancak olay tam olarak aydınlatılmamıştır.

Demir içeren SOD'lar (Şekil 1.7.) genellikle iki protein alt birimi taşırlar. Dimerik enzimler genelde enzimde molekül başına bir ya da iki demir iyonu taşırlar. Dinlenme durumunda demir Fe^{+3} şeklindedir ve katalitik döngü boyunca Fe^{+3} ve Fe^{+2} durumları arasında gidip gelir.



Mangan içeren SOD ile benzer olarak FeSOD da yüksek pH değerlerinde (pH 7'ye göre) düşük katalitik aktivite gösterir. Demir içeren SOD'ların aminoasit dizileri MnSOD'lar ile ileri derecede benzerlik gösterir ve CuZnSOD'lar ile farklıdır. Mangan içeren SOD'un aksine, CuZnSOD ve FeSOD ile uzun süreli uygulamalarda inaktive olurlar. Yüksek pH'larda CuZnSOD'un inaktivasyon oranı daha hızlıdır. Bunun nedeni hidrojen peroksit tarafından Cu^{+2} 'nin Cu^{+} 'ya redüksiyonu, devamında katalitik mekanizma için gerekli olan histidin rezidülerinden bir tanesini yıkan $\text{HO}^\cdot$ ya da diğer oksitleyici türleri oluşturmak üzere Cu^{+} 'nın hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesi olabilir.



- **Zincir: A (198 rezidü)**
[K&S: 9 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: B (198 rezidü)**
[K&S: 9 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: C (198 rezidü)**
[K&S: 9 heliks, 3 iplik]
- **Zincir: D (198 rezidü)**
[K&S: 9 heliks, 3 iplik]

● 4 Fe iyonu

Şekil 1.7. Demir içeren süperoksit dismutaz molekülü
(<http://www.biochem.uc.ac.uk /bsm/pdbsum/1ids/tracel.html>)

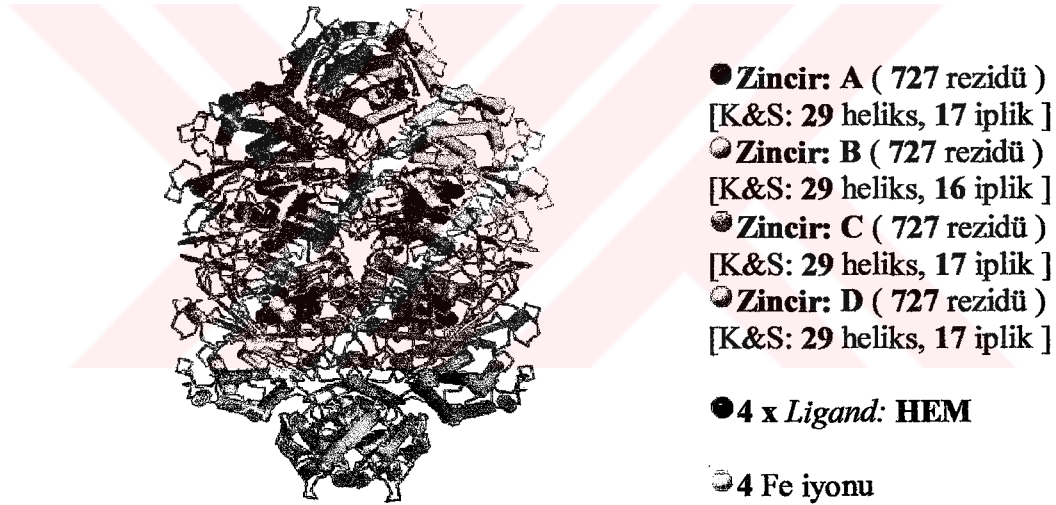
Süperoksit dismutaz türleri H_2O_2 ve potasyum siyanüre (KCN) verdikleri yanıtların farklılığı ile birbirlerinden ayrılırlar. Mangan içeren SOD H_2O_2 ve KCN'den etkilenmez. Demir içeren SOD H_2O_2 'ye duyarlıdır ancak KCN'den etkilenmez. Bakır çinko içeren SOD ise H_2O_2 ve KCN tarafından inhibe olur (Ahmad, 1995).

Bakır çinko içeren SOD ısıtmaya, proteazların etkilerine, guanidyum klorid, sodyum dodesil sülfat (SDS) ya da üre gibi bileşikler ile denatürasyona karşı oldukça dirençlidir. Mangan içeren SOD, CuZnSOD ile aynı reaksiyonu katalizler. Her iki

enzim için de pH 7’de oran sabitleri aynıdır, ancak CuZnSOD’un aksine alkali pH’da MnSOD’un oran sabiti azalır. Mangan içeren SOD ayrıca ısı ya da kimyasallar ile denatürasyona karşı daha duyarlıdır (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

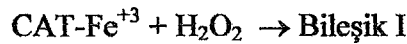
1.2.1.2. Katalaz

Katalaz, 250-270 kDa moleküler ağırlığa sahiptir, dört protein alt biriminden oluşur ve her biri aktif bölgeye bağlı bir hem (Fe^{+3} -protoporfirin) grubuna sahiptir (Şekil 1.8.). Ayrıca her bir alt birim enzimi stabilize etmeye yardım eden bir molekül NADPH taşır. Katalazın alt birimlerine ayrılması enzim aktivitesinin kaybolmasına neden olur.



Şekil 1.8. Katalaz molekülü (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1gg9/tracel.html>)

Katalazın reaksiyon mekanizması aşağıda verilmiştir:



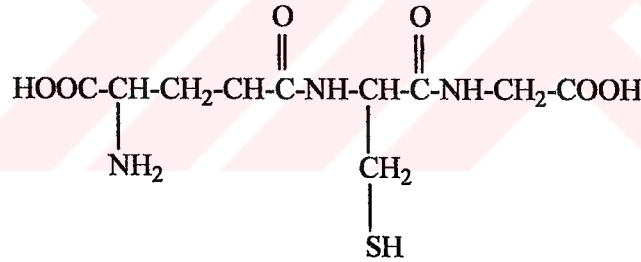
Katalaz ökaryotik hücrelerin çoğunda bulunur ve peroksizomal lokalizasyona sahiptir. Hidrojen peroksit, O_2 ’nin doğrudan iki-elektron redüksiyonu yoluyla ve $\text{O}_2^{\cdot -}$ radikalin aracılığı olmaksızın peroksizomal enzimlerin çoğu tarafından meydana

getirildiği için CAT'ın peroksizomal bulunuşunun stratejik önemi olduğu düşünülür. Peroksizomal turnoveri hızlıdır ve belirlenen yarı ömrü 1.5-2 gündür.

Katalaz, Michelis-Menten kinetiklerine uymaz. Non-saturasyon kinetikleri gösterir ve enzim aktivitesi H_2O_2 ile lineer olarak artar. Dolayısıyla K_m değeri belirlenemez ve saturasyon konsantrasyonunda bile enzim H_2O_2 'yi parçalar (Ahmad, 1995).

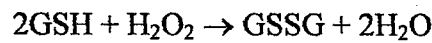
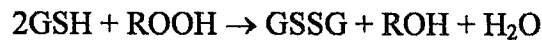
1.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz enzimi 1957 yılında G.C. Mills tarafından hayvan dokularında keşfedilmiştir. Bazı alg ve mantarlarda bulunmasına karşın genellikle yüksek yapılı bitkilerde ve bakterilerde bulunmaz. Substratı hayvanlarda, bitkilerde ve aerobik bakterilerin çoğunda milimolar düzeylerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı tiyol bileşik GSH'dır (Şekil 1.9.).



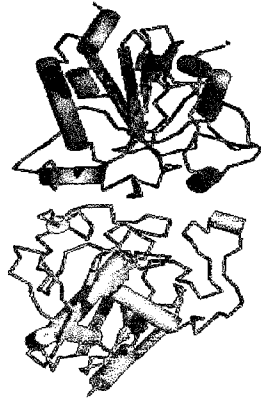
Şekil 1.9. Glutasyon (Horton ve Fairhurst, 1987).

Enzim hidrojen donorü olarak GSH için spesifiktir ancak H_2O_2 'nin yanı sıra diğer peroksidleri de kabul eder. Glutasyon peroksidaz, hidroperoksidlerin detoksifikasyonunda en önemli peroksidazdır. Hidroperoksidlerin ve H_2O_2 'nin GSH bağımlı redüksiyonunu katalizler;



Glutasyon peroksidaz, moleküler ağırlığı 76-105 kDa arasında değişen tetramerik bir proteindir ve molekül başına dört selenyum atomuna sahiptir (Şekil 1.10.). Aktif bölgede selenosistein olarak bulunur. Aminoasit sisteinde normal sülfür

atomu bir selenyum atomu ile yer değiştirmiştir. Glutasyon selenyumunu indirger ve enzimin indirgenmiş formu H_2O_2 ile $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$ oran sabitinde reaksiyona girer.



● **Zincir: A** (185 rezidü)
[K&S: 8 heliks, 4 iplik]

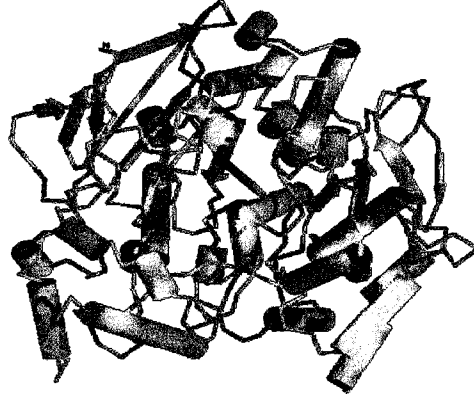
● **Zincir: B** (185 rezidü)
[K&S: 8 heliks, 4 iplik]

Şekil 1.10. Glutasyon peroksidaz molekülü (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1gp1/trace1.html>)

Glutasyon peroksidaz, selenyuma bağımlı olan ve olmayan GPx olmak üzere ikiye ayrılır. Selenyuma bağımlı GPx, H_2O_2 ve organik hidroperoksidleri indirgeyebilir. Selenyuma bağımlı olmayan GPx ise H_2O_2 ile inaktiftir ve sadece organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz enzimi H_2O_2 , lipid hidroperoksidler ve diğer organik hidroperoksidlerin redüksiyonu yolu ile serbest radikal ürünlerin birikimi ve oksidatif strese karşı koruma sağlar (Tappel ve ark., 1982; Cnubben ve ark., 2001; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

1.2.2. Asetilkolinesteraz

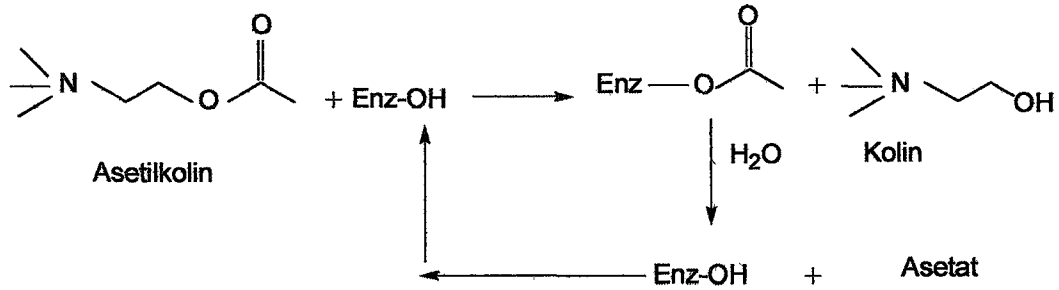
Asetilkolinesteraz, nörotransmitter asetilkolinin (ACh) kolin ve asetata hidrolizi ile biyolojik aktivitesinin sonlandırılmasından ve yıkımından sorumludur. Asetilkolinesteraz molekülü her biri 80 kDa moleküler ağırlıkta ve etkin noktaları ayrı dört alt birimden meydana gelen bir proteindir (Şekil 1.11.).



● **Zincir: A** (532 rezidü)
[K&S: 26 heliks, 14 iplik]

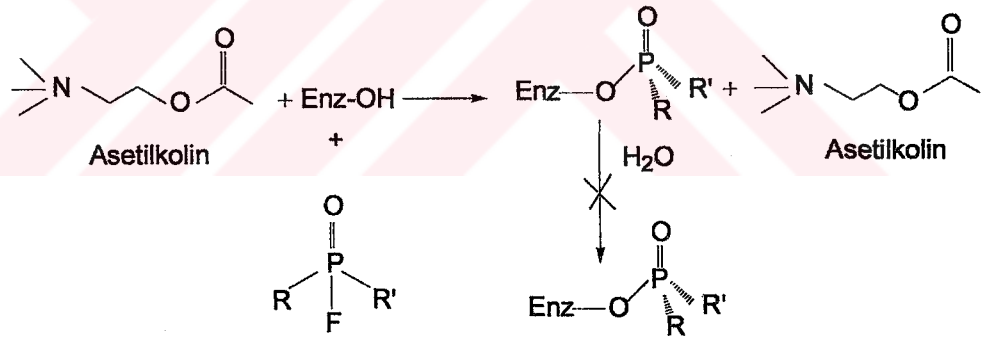
Şekil 1.11. Asetilkolinesteraz molekülü (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1qid/tracel.html>)

Enzimde esteratik ve anyonik olarak bilinen iki etkin kısım vardır. Anyonik kısım negatif yüklü olup iki karboksilli bir aminoasitin iyonize karboksil grubundan ibarettir. Asetilkolinin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esteratik kısım pozitif yüklüdür ve iki kısımdan oluşur. Bunlardan birincisi serinin hidroksil grubudur ve ACh molekülündeki karbonil atomu buraya kovalent olarak bağlanır. İkincisi histidinin bazik imidazol halkasıdır. Bu kısım serinin hidroksil grubuna hidrojen bağları ile bağlanarak onun etkinliğini artırır. Ayrıca ACh'nin katyonik azotuna bağlı iki metil grubu da enzimin anyonik kısmına Van der Waals bağları ile bağlanır. Enzime bağlanmasından sonra ACh molekülü hidroliz olarak kolin asetil grubundan ayrılır, böylece enzim asetillenir. Daha sonra enzime bağlı asetil grubunun elektrofilik karbon atomu bir su molekülü alarak enzimden ayrılır ve enzim yeniden kazanılır (Şekil 1.12.) (Kaya ve ark., 1995).



Şekil 1.12. Asetilkolinin transesterifikasyonu ve hidroliz ile AChE'nin rejenerasyonu (Wright ve ark., 2002).

Organofosforlu insektisitler endojen nörotransmitter asetilkolin ile bazı yapısal benzerliklere sahiptirler ve toksik etkilerini AChE'nin geri dönüşümsüz inhibisyonu yolu ile gösterirler. Bu maddeler AChE enziminin aktif merkezi ile sadece esteratik noktada etkileşirler. Bu maddeler enzimin psödo-substratıdır ve enzimin esteratik noktasına, doğal substrat asetilkolin gibi bir asetil (asil) grubu değil, moleküllerinin dialkil fosfat (dialkil fosforil veya dialkilfosfonil) grubunu transfer ederler. Bu grubun fosfor atomu ile esteratik noktanın serin aminoasit rezidüsünün hidroksil grubu arasındaki kovalent bağ su ile çok yavaş bir şekilde koparılır. Girişim yapılmaz ise sinaps ve kavşaklarda organofosfatla inhibe edilmiş enzim etkinliğinin yeniden başlaması genellikle yeni enzimin sentezi yoluyla olur ve haftalar hatta aylar sürer. Enzimin asil bağlayan noktasına transfer edilen dialkilfosfat grubundan, organofosfatın türüne göre bir alkil grubu hızlı veya yavaş bir şekilde ayrılır ve geriye monoalkilfosfat grubu kalır. Bu durumda fosfor serin arasındaki bağ daha da güçlenir ve hidroksilamin bileşikleriyle bile kırılması zorlaşır, bu dönüşüme eskime (aging) denir (Kayaalp, 1998).

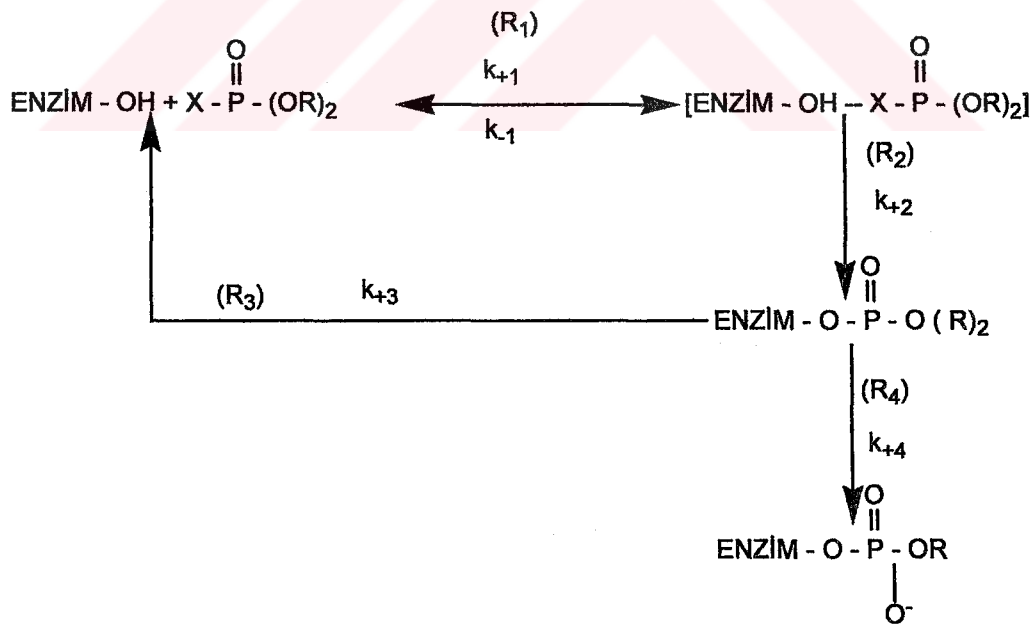


Şekil 1.13. Asetilkolinesterazın fosforilasyonu ve asetilkolin birikimi (Wright ve ark., 2002).

Asetilkolinesteraz inhibisyonu otonomik gangliya ve post gangliyonik sinir sonlarında, merkezi sinapsların bazılarında ve nöromuskular bağlantı noktalarında ACh birikimine neden olur. Bunun sonucunda ACh otonomik gangliya, merkezi sinir sistemi, kalp, salgı bezleri ve düz kaslarda bulunan muskarinik reseptörlere ve otonomik gangliya, iskelet kası ve merkezi sinir sisteminde bulunan nikotinik reseptörlere bağlanır ve onları uyarır (Şekil 1.13.).

Ana bileşikler zayıf AChE inhibitörü olduklarından, mikrozomal çok fonksiyonlu oksijenaz sistemi yoluyla okson oluşumu bir aktivasyon basamağı olarak düşünülebilir. Diazinonun toksik etki mekanizması diğer organofosforlu pestisitlerde olduğu gibi AChE inhibisyonudur. Asetilkolinesterazı inhibe eden diazinonun kendisi değil metaboliti olan diazoksondur (Keizer ve ark.,1995).

Organofosforlular ile AChE ya da diğer esterazların inhibisyonunun kimyası Şekil 1.14.'te verilmiştir. Michaelis kompleksinin oluşumundan sonra (Reaksiyon 1), proteindeki spesifik bir serin rezidüsü ayrılan grup X'in kaybı ile birlikte fosforlanır (Reaksiyon 2). Bundan sonra iki reaksiyon olasılığı vardır; Reaksiyon 3 (reaktivasyon), bağlanan grubun yapısına ve proteine bağlı olarak kendiliğinden meydana gelebilir. Ayrıca pH ve reaktivasyonu katalizleyen oksimler gibi nükleofilik bileşiklerin eklenmesinden de etkilenir. Reaksiyon 4 (eskime), R-O-P bağının ayrılmasını kapsar. R kaybedilir ve proteine bağlı yüklü monosubstitue bir fosforik asit rezidüsü oluşur. Reaksiyon eskime olarak adlandırılır çünkü zamana bağlıdır ve ürün artık reaktivasyona neden olan nükleofilik ajanlara yanıt vermez (Moretto ve Johnson, 1987).



Şekil 1.14. Organofosforlu bir bileşik tarafından bir esterazın inhibisyonu
1) Michaelis kompleksinin oluşumu, 2) Enzimin fosforilasyonu,
3) Reaktivasyon reaksiyonu, 4) Eskime (Moretto ve Johnson, 1987).

Kan, beyin ve diğer dokularda AChE aktivitesinin inhibisyonu zamana bağlı bir şekilde gerçekleşir. İnhibisyonun boyutu reaksiyonun oran sabitine ve enzimin okson etkisinde kalma süresine bağlıdır. Asetilkolinesterazın kendiliğinden reaktivasyonu organofosforlu bileşiğin yapısına bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan organofosforlu insektisitlerin çoğu fosfor atomuna bağlı olarak ya iki metil ya da iki etil ester grupları taşırlar. Dolayısı ile dimetilfosforlanmış ya da dietil fosforlanmış AChE meydana gelecektir. Dimetilfosforlanmış AChE'nin kendiliğinden reaktivasyonu oldukça hızlıdır. Dietilfosforlanmış AChE için ise bu durum söz konusu değildir. Fosforlanmış enzim AChE'nin aktif bölgesinde serin grubunun kısmen dealkilasyonu ile eskiyebilir. Eskimenin oranı organofosforlu bileşiğin yapısına bağlıdır. Fosforlanmış enzimin eskimesi reaktivasyonu mümkün olmayan inaktif bir enzim ile sonuçlanır. Asetilkolinesteraz aktivitesinin normale dönmesi için karaciğerde yeni enzim sentezine ihtiyaç vardır (Vale, 1998).

2.1.1. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz

Canlı hücrelerin iyonik çevrelerindeki değişimlere yanıt vermesi ve sabit bir iç ortamı koruması onların özelliklerinden biridir. Çevresel bozulmalara yanıt olarak hücreler homeostazisi korumak üzere spesifik membran bağlı transport sistemlerini aktive ederler. Hücrelerarası ve hücre içinde metabolik enerjinin, hücresel fonksiyon ve sinyal iletimi ile birleşmesi iyonların hücre membranındaki asimetric dağılımına bağlıdır. Kendilerini çevreleyen ortama göre tüm hücreler daha fazla K^+ ve daha az Na^+ taşırlar ve bu katyon konsantrasyon farkı sıkı biçimde düzenlenir (Mobasheri ve ark., 2000).

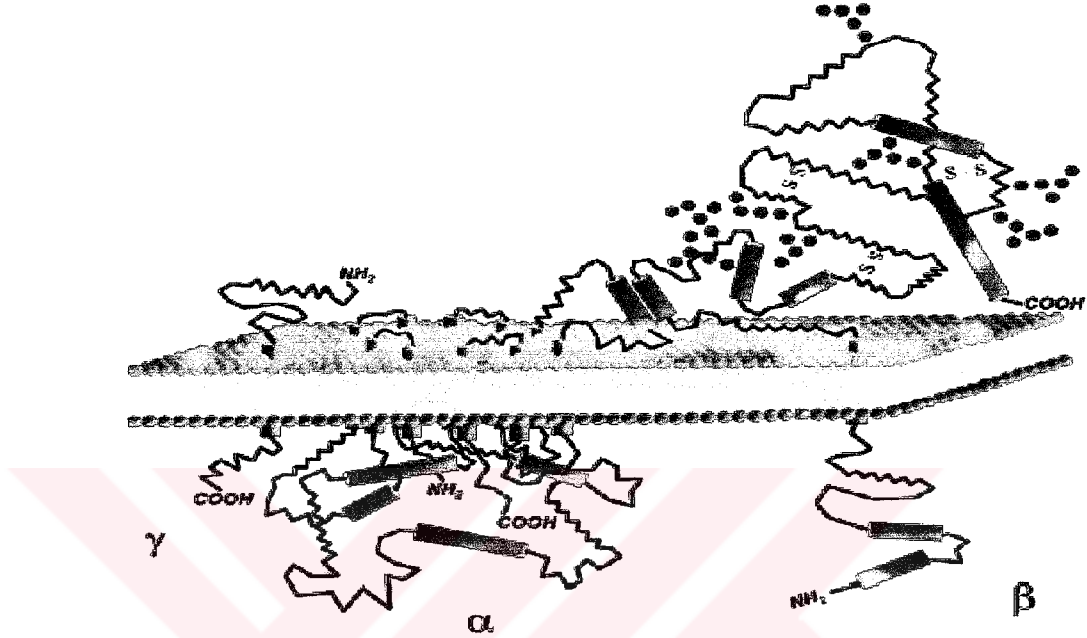
Sodyum potasyum adenozin trifosfataz, adenozin trifosfatın (ATP) adenozin difosfata (ADP) hidrolizini katalizleyerek, Na^+ ve K^+ iyonlarının transportundan sorumludur ve enzim Mg^{+2} tarafından aktive edilir. Transport işlemi için gerekli olan enerji ATP'den sağlanır. Sodyum potasyum adenozin trifosfataz hücre içine alınan her 2 K^+ iyonuna karşılık, 3 Na^+ iyonunu dışarı pompalar. Sodyum potasyum adenozin trifosfataz fonksiyonu ile K^+ 'un hücre içinde birikimine neden olur ki bu durum intrasellüler enzimlerin aktivitesi için önemlidir. Potasyum iyonu

konsantrasyonunun yaklaşık 5 mM olduğu hücre dışı ortamdan aktif pompalama yolu ile K^+ 'nın hücre içi konsantrasyonunu 120-140 mM düzeyinde korunmalıdır. Sodyum potasyum adenozin trifosfataz beyin, iskelet kası, kalp kası ve epiteller gibi uyarılabilen dokularda çok miktarda, diğer doku ve hücre tiplerinde de orta düzeyde sentezlenir.

1.2.3.1. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfatazın Yapısı

Sodyum potasyum adenozin trifosfataz α , β ve γ olmak üzere üç polipeptid alt birimden oluşur. Alfa alt birim 1018 rezidüden oluşur ve $M_r = 100-112$ kDa'dur. Beta alt birim 300 rezidüden oluşur ve $M_r = 55$ kDa'dur. Gama, $M_r = 6.5-10$ kDa olan transmembran bir proteindir. Alfa, kardiyak glikozidler, iyonlar ve ATP için bağlanma bölgeleri ve geçici fosforilasyon bölgesi (bir aspartat rezidü, D369) taşıyan katalitik bir alt birimdir. Memeli hücrelerinde dört α izoformu tanımlanmıştır. Proteinin N ve C uçları intrasellüler lokalizasyondadır ve protein 10 transmembran kısım ve iki büyük intrasellüler ilmiğe sahiptir. Alfa1 izoformu tüm hücrelerde, $\alpha 2$ izoformu iskelet kası, adipositler beyin ve küçük miktarda kalpte, $\alpha 3$ izoformu başlıca sinirler ve beyinde ve $\alpha 4$ izoformu sadece testiste bulunur. Beta alt birimler kısa bir sitoplazmik kuyruk, bir transmembran segment ve glikozillenmiş büyük bir ekstrasellüler segmente sahip glikoproteinlerdir. Fonksiyonunun tam olarak bilinmemesine karşın, varlığı ve α alt birim ile heterodimerizasyonu enzimin sentezi ve aktivitesi için gereklidir. Beta alt birimlerin α alt birimlerin proteolitik enzimlere karşı duyarlılığını değiştirdikleri görülmüştür. Beta alt birimlerin üç izoformu vardır; $\beta 1$ tüm dokularda, $\beta 2$ gliya ve beyinde, $\beta 3$ iskelet kası, akciğer ve beyinde sentezlenir. Beta alt birimler ekstrasellüler kısımda üç S-S köprüsü ve 3-7 N-bağlı şeker zinciri taşırlar ve bu yapılar β alt birimin uygun şekilde katlanması, fonksiyon görmesi ve α alt birim ile etkileşimi için gereklidir. α alt birim iyonlar, ligandlar ve ATP için temel bağlanma yerlerini taşımasına karşın, β alt birim ligandlar için bağlanma yerlerinin oluşumuna katılır ve pompanın iyon transport fonksiyonunu düzenler. Beta alt birime benzer olarak, γ altbirim plazma membranı boyunca uzanır

ancak amino ucu ekstrasellülerdir. Sodyum potasyum adenozin trifosfatazın α , β ve γ alt birimlerinin üç boyutlu yapıları Şekil 1.15.'te verilmiştir (Köksoy, 2002; Mobasheri ve ark., 2000).



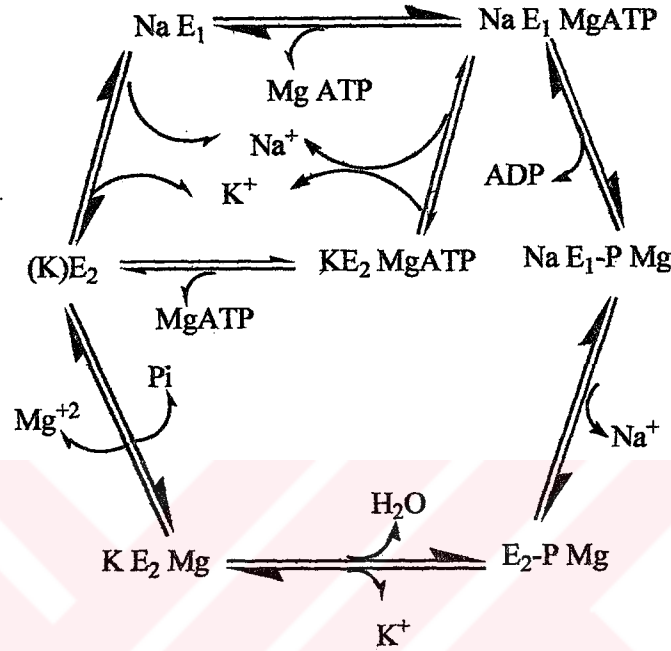
Şekil 1.15. Sodyum potasyum adenozin trifosfatazın topolojik yapısının üç boyutlu modeli (Mobasheri ve ark., 2000).

Sodyum potasyum adenozin trifosfatazın bu modelinde katalitik α alt birim plazma membranını 10 kez geçer ve sitosoldaki NH_2 ve COOH uçları görülmektedir. Beta alt birim plazma membranını 1 kez geçer ve NH_2 ucu sitosoldedir. Alfa-heliksler ve β -kıvrımlı levhalar sırasıyla silindir ve zig-zag şeklinde gösterilmiştir. Gama alt birim de plazma membranını 1 kez geçer ve COOH ucu sitosoldedir.

Sodyum potasyum adenozin trifosfataz mekanizmasının aşamaları;

1. Hücrenin iç kısmında üç Na^+ iyonu enzime (E_1) bağlanır,
2. İzoergonik bir işlem ile ATP, enzimin alfa-alt birimini fosforlar,
3. E_2 oluşturmak üzere konformasyonel değişim geçiren enzim, üç Na^+ iyonunu hücrenin dışına getirir. Fosfat aynı aspartil gruba bağlı olarak kalır,
4. Potasyum, Na^+K^+ -ATPaz'ın dış kısmına bağlanır ve iç kısma taşınır,
5. Enzim ekzergonik bir hidrolitik defosforilasyon reaksiyonu geçirir,

6. İki K^+ iyonu hücre içine salınır. Enzim orijinal E_1 konformasyonuna çevrilir (Şekil 1.16.).



Şekil 1.16. Sodyum potasyum adenzin trifosfatazın reaksiyon döngüsü (Mobasher ve ark., 2000)

Sodyum bir elektrokimyasal gradiente karşı taşınır. Net transport işlemi elektrojeniktir çünkü dışarıya taşınan pozitif elektronların sayısı içeriye taşınan pozitif iyonların sayısını aşar. Sodyum potasyum adenzin trifosfataz hücre içi Na^+ : K^+ oranını düşük düzeyde tutar bu normal hücresel aktivite ve optimum hücresel fonksiyon için gereklidir. Hücre hacmi, ısı üretimi gibi önemli hücresel fonksiyonlar ile hücre içi pH düzenlenmesini de doğrudan ya da dolaylı olarak kontrol eder (Ganong, 1999). Sodyum potasyum adenzin trifosfataz Na^+ ve K^+ iyonlarının hücre membranından aktif transportu için enerji sağlayarak ozmoregülasyonda rol oynar (Yadwad ve ark., 1990).

1.2.3.2. Hücre Hacminin Kontrolünde Na^+K^+ Pompasının Önemi

Sodyum potasyum pompasının en önemli fonksiyonlarından birisi hücre hacminin kontrolüdür. Bu pompanın fonksiyonu olmaksızın vücut hücrelerinin çoğu

patlayıncaya kadar şişerler. Hacmin kontrol mekanizması şöyledir. Hücrenin iç tarafında hücreden çıkamayan çok sayıda protein ve başka organik bileşikler bulunur. Bunların çoğu negatif yüklü olduğu için etraflarına çok sayıda pozitif iyon toplanır. Bütün bu maddeler suyun ozmosla hücrenin içine girmesi yönünde etki yaparlar. Eğer bu kontrol edilmez ise hücre patlayıncaya kadar şişer. Bunu önleyen normal mekanizma Na^+K^+ pompasıdır. Bu düzenek içeriye pompalanan her iki potasyum iyonuna karşılık üç sodyumu dışarıya pompalar. Aynı zamanda membran sodyum iyonlarına, potasyum iyonlarına göre çok daha az geçirgen olduğundan dışarıya çıkarılan sodyum iyonlarının orada kalma eğilimleri büyüktür. Böylece hücreden sürekli olarak iyonların net kaybı suyu hücreden dışarıya çekerek zıt yönde bir ozmotik eğilim yaratır. Bundan başka hücre şişmeye başladığı zaman otomatik olarak aktifleşen Na^+K^+ pompası daha fazla iyonu dışarı çıkarır. Su da onlarla beraber hücreden ayrılır. Böylece Na^+K^+ pompası normal hücre hacminin korunmasında sürekli bir denetim görevi yapar (Ganong, 1999).

1.2.3.3. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Etkinliğinin Düzenlenmesi

Hücrelerde bulunan normal Na^+ miktarı doygunluğa ulaşmaz, bu nedenle bir miktar artacak olursa pompa etkinliğinin de artması nedeniyle hücreden dışarıya atılan Na^+ miktarı artar. Pompa etkinliği cAMP, diasilgliserol (DAG) ve arakidonik asit türevler dahil hücrede üretilen ikinci haberciler tarafından etkilenir. Gözlenen etkilerin büyüklüğü ve yönü deneysel koşullara göre değişir. Tiroid hormonları, Na^+K^+ -ATPaz moleküllerinin oluşumunu genomik etki ile artırarak pompa etkinliğini artırır. Aldesteron da pompa sayısını artırır, fakat bu etki olasılıkla ikincildir. Dopamin, böbreklerde fosforilasyon yoluyla pompayı inhibe eder ve natriürece neden olur (Ganong, 1999).

2.1.2. Lipid Peroksidasyonu

Lipid hücreleri ve hücresel organelleri çevreleyen membranın önemli bir bileşenidir. Membran lipidlerinin oksidatif bozulması lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin serbest radikallerle etkileşerek bir seri reaksiyon sonucu bozulmaları ve lipid hidroperoksidlerin oluşmasıdır. Lipid peroksidasyonu sırasında polar oksijen kısım (hidroperoksi kısım) poliansatüre yağ asitlerinin hidrofobik kuyruklarına sokulur. Bu işlemin iki sonucu vardır;

1. Hidroperoksi grup varlığında hidrofobik lipid/lipid ve lipid/protein etkileşimleri bozulur. Bu durum biyomembranlarda ve lipoproteinlerde yapısal değişime neden olur.
2. Hidroperoksi lipidler diğer membran ve/veya lipoprotein bileşenlerde ikincil modifikasyonları indükleyen serbest radikal oluşumunun kaynağıdır (Kuhn ve Borchert, 2002).

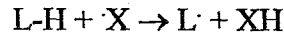
Peroksidasyon sonucunda lipid hidroperoksidler, lipid epoksidler, epoksi alkoller ve MDA, etan, pentan gibi kısa zincirli bileşikler ile 4-hidroksi-nonenal (4-HNE) oluşur. Malondialdehit ve 4-HNE gibi aldehidlerin biyolojik aktiviteleri DNA ve proteinler ile çapraz bağlanarak moleküllerin fonksiyonunu/aktivitesini değiştirmeleri şeklindedir (Griffiths ve ark., 2002). Biyolojik sistemlerde MDA üreten tek mekanizma lipid peroksidasyonudur. Malondialdehit lipid peroksidasyonunun ana ürünü değildir, ancak tipik parçalanma ürünüdür ve lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. Ksenobiyotikler serbest radikal oluşumunu arttırarak ya da hücrenin peroksidasyon reaksiyonlarına karşı savunma kapasitesini azaltarak lipid peroksidasyonunu arttırabilirler (Horton ve Fairhurst, 1987; Lackner, 1998).

Lipid peroksidasyonu başlama, ilerleme ve sonlanma olmak üzere üç aşamada yürür;

1. Başlama

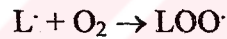
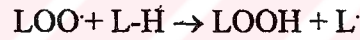
Hidroksil radikal gibi oksitleyici bir radikal türün poliansatüre yağ asitlerinden bir allilik hidrojen atomu ayırması ile lipid peroksidasyonu başlar.

Poliansatüre yağ asitlerinden allilik hidrojenin ayrılması ile lipid radikal (L $\cdot$) oluşur. Aerobik ortamda bu radikal oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksil radikal (LOO $\cdot$) oluşur. Yüksek reaktivitesi nedeniyle, HO $\cdot$ doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek sistemden bir hidrojen atomunun ayrılması ile ya da çifte bağların eklenmesi yolu ile karbon-merkezli radikal oluşturur.



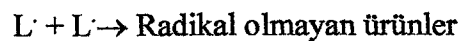
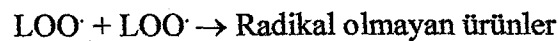
2. İlerleme

Başlama ve ilerleme işlemlerinde üretilen karbon merkezli radikaller moleküler düzenlenmeye uğrarlar. Lipid peroksil radikal başka bir lipid molekülden bir allilik hidrojen molekülü ayrılır. Böylece lipid hidroperoksid (LOOH) ve ikinci bir lipid radikal oluşur (L $\cdot$). Lipid peroksil radikal başka bir lipid molekülden bir hidrojen atomu ayırma yeteneğindedir. Bu lipid peroksidasyonunun ilerlemesine neden olur. Oluşan karbon radikal başka bir peroksil radikal oluşturmak üzere ileri oksijen eklenme reaksiyonu geçirebilir ve böylece lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları devam eder. Lipid peroksil radikal hidrojen atomu ile birleşerek bir LOOH oluşturur (Şekil 1.17).

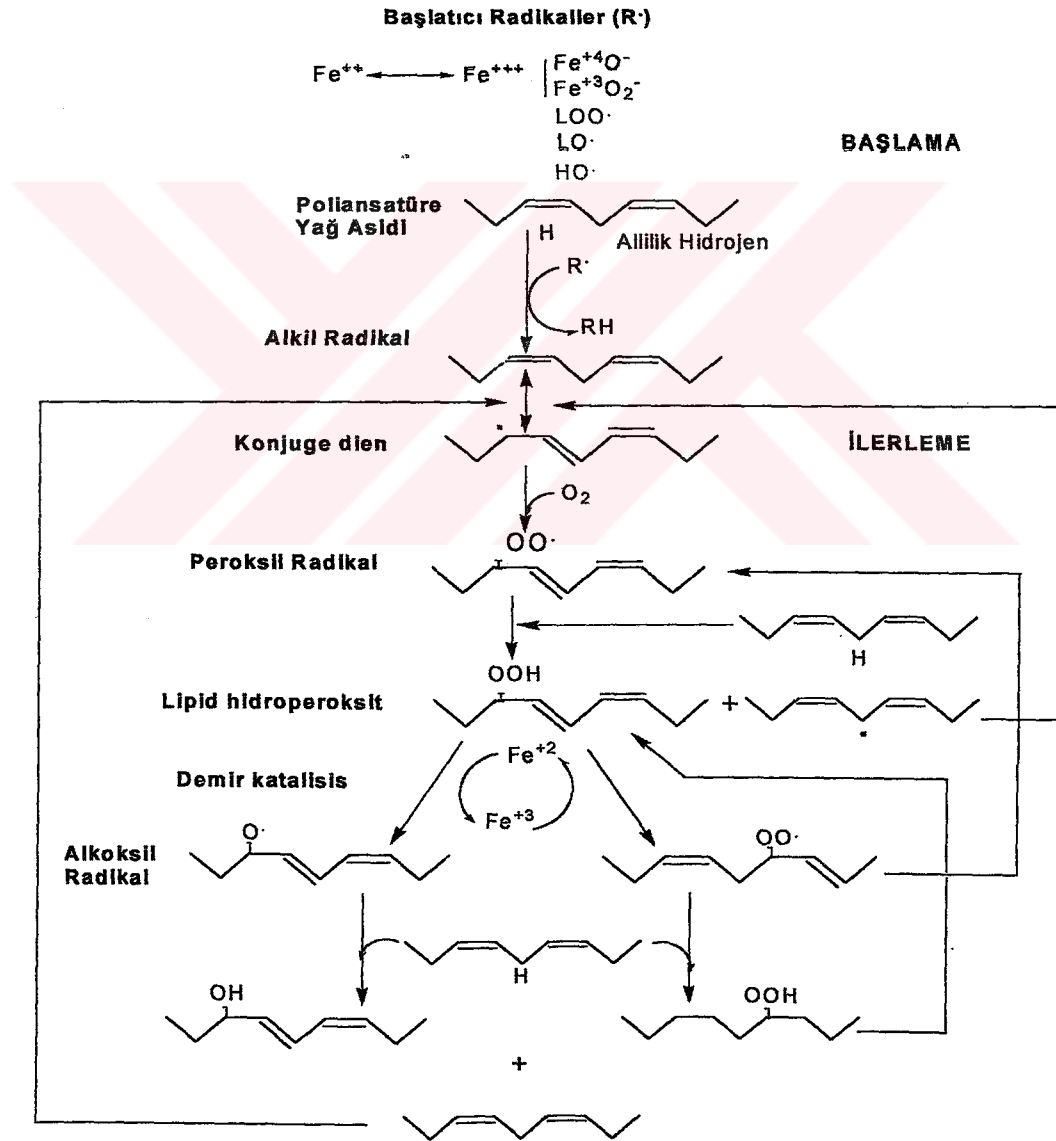


3. Sonlanma

Başka bir radikal, protein ya da serbest radikal yakalama yeteneğindeki birleşik ile reaksiyon sonucu sonlanma meydana gelir ve stabil son ürün oluşur. Oluşan hidroperoksid lipid peroksidasyon işlemini bitirmek üzere farklı reaksiyonlar geçirebilir. Bir hidroksi yağ asidine indirgenebilir ya da siklik endoperoksidleri oluşturmak üzere siklizasyon geçirebilir. Bu endoperoksidler siklooksigenaz ve lipoksigenaz yolları ile biyolojik olarak aktif prostaglandin, tromboksanaz ve lökotrienleri oluşturmak üzere reaksiyonları başlatabilir. Bu son ürünlerin oluşumu lipid peroksidasyonunun sonlanma aşamasını oluşturur.



Radikaller, aldehydler ve lipid peroksidasyonunun diğer ürünleri arasındaki kompleks reaksiyonlar membran proteinlerinde önemli zararlara neden olabilir. Karaciğer ya da eritrosit membranlarında meydana gelen peroksidasyon membran içinde yüksek moleküler kütleli protein agregatlarının oluşumuna neden olur. Hücrelerin hormonlara cevap vermesine izin veren yüzey reseptör moleküller lipid peroksidasyonu sırasında inaktive olabilirler. Ayrıca hücrelerde doğru iyon dengesinin korunmasında yer alan Na^+K^+ -ATPaz gibi enzimlerin de inaktivasyonuna neden olabilir.



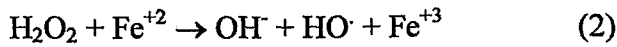
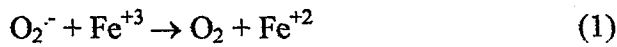
Şekil 1.17. Lipid peroksidasyonu kimyası (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Genel olarak lipid peroksidasyonunun etkileri membran akışkanlığının azalması, membranın normal olarak onu geçemeyecek maddelere karşı (Ca^{+2} gibi) zayıflığının artması ve membrana bağlı enzimlerin inaktivasyonudur. Aldehidleri ve pentan gibi hidrokarbonları üretmek üzere yağ asidi zincirlerinde devam eden fragmentasyon membran bütünlüğünün tamamen kaybolmasına neden olur. Bu yolla lizozom membranlarının bozulması lizozomal enzimleri komşu hücrelere boşaltarak lipid peroksidasyonunun neden olduğu zararın artmasına neden olur. Aynı şekilde eritrosit membranlarının bozulması onların şekil değiştirme yeteneğini bozar ve hemolize neden olur (Halliwell ve Gutteridge, 1999).

1.2.4.1. Metal Aracılıklı Peroksidasyon

Demir ve bakır gibi geçiş metaller serbest radikaller ile yürütülen lipid peroksidasyonu reaksiyonlarının çoğunun başlatılmasında önemli rol oynarlar. Çoğu durumda bu metaller önce askorbat, O_2^- ya da tiyoller gibi indirgeyici ajanlar ile aktive edilirler. Metal iyonlarının aracılık ettiği peroksidasyon iki kategoriye ayrılır; LOOH bağımsız ve LOOH bağımlı başlama. İlk durumda, başlangıçta hidroperoksidler yoktur ya da H_2O_2 ile rekabet edemeyecek kadar düşük miktarlarda bulunurlar. İkinci durumda başından beri önemli miktarlarda LOOH bulunur. LOOH bağımlı başlama O_2^- ve H_2O_2 tarafından yürütülür.

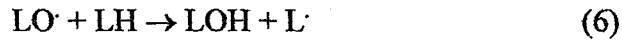
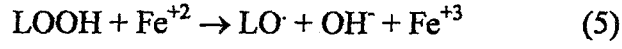
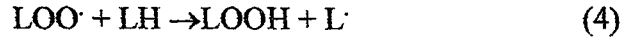
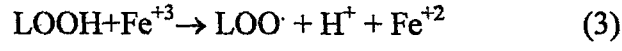
Redoks metal olarak demir varlığında mekanizma demir-katalizli Haber-Weiss döngüsüdür. Bu döngüde O_2^- tarafından Fe^{+3} 'ün redüksiyonu (Reaksiyon 1) H_2O_2 tarafından Fe^{+2} reoksidasyonu (Reaksiyon 2) ile birleşir.



İkinci aşama $\text{HO}^\bullet$ oluşumu ile sonuçlanan Fenton reaksiyonudur. Bakır (II) indüklü reaksiyonlar için de benzer mekanizma yer alır.

Peroksidasyonun LOOH bağımlı başlaması bağlı redoks metaller ile, özellikle demir, indüklenir. Lipid hidroperoksidin aktivasyonu için iki genel yol vardır. a) Demir (III) ile LOOH oksidasyonu ve sonrasında $\text{LOO}^\bullet$ ile hidrojen ayrılması

(Reaksiyon 3 ve 4) ve b) Demir (II) ile LOOH redüksiyonu ve sonrasında LO $\cdot$ ile hidrojen ayrılması (Reaksiyon 5 ve 6).



Süperoksit radikal, askorbat ve tiyoller gibi demir indirgeyiciler LOOH bağımlı lipid peroksidasyonunun başlamasını yürütürler (Girotti, 1985).

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Diazinonun toksisitesi ile ilgili olarak çevre koruma örgütleri, üniversiteler ve araştırma merkezleri tarafından rezidü belirleme çalışmaları yapılmaktadır. Bu amaçla yurdumuzda veri bulunamamakla birlikte EPA'nın verilerine göre 1993 ve 1995 yıllarında Teksas'ta Rio Grande Vadi'sinde yer altı sularında 0.077 ppb ve 1994 ve 1995 yıllarında Santa Fe Irmağında 0.21 ppb düzeylerinde diazinon belirlenmiştir (Lewings ve ark., 1998). Letal derişimleri memelilerde 300-400 mg/kg ve kuşlarda 3-40 mg/kg arasında değişir, balıklarda yüksek toksisite gösterir. *A. anguilla*'da 24, 48, 72 ve 96 saat LC₅₀ değerleri sırası ile 0.16, 0.11, 0.09 ve 0.086 ppm olarak bulunmuştur (Sancho ve ark., 1993). *Brachydanio rerio*'da LC₅₀ değerlerinin süre ile birlikte azaldığı bildirilmiş 24, 48, 72 ve 96 saat LC₅₀ değerleri sırasıyla 2.30, 2.24, 2.19 ve 2.12 ppm olarak belirlenmiştir (Ansari ve ark., 1987).

Balıklarda ksenobiyotiklerle ilgili olarak giderek artan sayıdaki çalışmalar toksik etki ve savunma mekanizmalarını aydınlatırken (Di Giulio ve ark., 1989) tüketicilerin bilinçlenmesine, kontamine balıklara karşı duyarlı olmalarına neden olmuş ve tarım endüstrisini tarımsal ürünlerin güvenliğini destekleyecek veriler toplamak üzere harekete geçirmiştir (Santerre ve ark., 2000).

Bu amaçla ksenobiyotiklerin akuatik organizmalardaki etkilerini belirlemek üzere başlıca akut toksisite testleri yapılmıştır. Ancak ksenobiyotiklerin subletal derişimleri organizmalarda ve ekosistemlerde zararlı etkilere neden olabileceğinden kronik testlere de gereksinim vardır (Vander Wel ve Welling, 1989).

Son yıllarda çevresel kalite ve organizmaların adaptasyonlarının izlenmesinde biyoindikatörlerin bir araç olarak kullanılması önem kazanmıştır (Stegeman ve ark., 1991). Oksiradikal aracılıklı yanıtların biyokimyasal biyoindikatörleri sağlamasındaki potansiyelin kullanışlılığından dolayı antioksidan savunma sistemi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır (Di Giulio ve ark., 1989; Winston ve Di Giulio, 1991).

Bu araştırmalarda anahtar bileşikler oksidatif stres ile indüklenebilen enzimlerdir. Bu enzimler SOD, CAT ve GPx'tir ve balıklarda oksiradikaller ile reaksiyonları araştırılmıştır (Di Giulio ve ark., 1989). Akuatik ksenobiyotiklerin

etkisinde balıklardaki antioksidanlar biyoindikatör olarak kullanılabilmektedir (Ahmad ve ark., 2000). Farklı türlerde antioksidan savunma sisteminin temel kalitatif ve kantitatif benzerliklerini, varsa farklılıklarının bilinmesi biyoindikatörlerin geliştirilmesinde gereklidir (Livingstone, 1998).

Pestisitler serbest radikal üretimiyle ve antioksidanlar ya da serbest radikal temizleyen enzim sistemlerinde değişime neden olarak oksidatif stres oluşturabilirler (Almeida ve ark., 1997). Pestisit-indüklü toksisitede yer alan moleküler mekanizmalardan birinin lipid peroksidasyonunun olduğu ileri sürülmüştür (Kehrer, 1993).

Reaktif oksijen türlerin üretimini arttıran pestisitlere karşı antioksidan enzimlerin yanıtlarıyla ilgili çok sayıda çalışma bildirilmiştir.

Thomas ve Murthy (1976), monocrotophorus etkisinde *Heteropneustes fossilis*'te karaciğer ve böbrek dokularında CAT enzim aktivitesinin sırası ile %33 ve 41 oranlarında azaldığını bildirmişlerdir.

Ictalurus punctatus'ta S,S,S-tributyl phosphorotrithioate ve metaboliti n-butyl mercaptan etkisinde SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ile MDA miktarında önemli düzeyde değişim olmadığı bildirilmiştir (Mather-Mihaich ve Di Giulio, 1986).

H. fossilis'te beyin dokusunda 3, 6 ve 9 ppm dichlorvos etkisinde MDA miktarının doza bağlı olarak arttığı bildirilmiştir (Yadhva ve Hasan, 1986).

Hai ve ark. (1997), *C. carpio*'da beyin dokusunda 24 saat 1 ve 5 ppm dichlorvos etkisinde GPx aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *Ictalurus nebulosus*'da karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında SOD aktivitesinin arttığı, böbrek dokusunda enzim aktivitesinde bir değişiklik olmadığı bildirilmiştir. Pestisit uygulaması bu balık türünde önemli bir değişime neden olmazken, CAT aktivitesi doza bağımlı olarak artmıştır.

Oruç ve Üner (2000) 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile 0.03 ppm azinphosmethyl uygulamasının *Oreochromis niloticus*'ta karaciğer dokusunda SOD, CAT, GPx enzim aktiviteleri ile MDA miktarına etkilerini araştırmışlardır. 24, 48 ve 72 saat süreler ile azinphosmethyl uygulanmalarından sonra SOD aktivitesinde değişim olmazken, 96 saat uygulama SOD aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. 24, 48 ve 72 saat uygulamalar GPx aktivitesini değiştirmemiş, 96 saat sonra GPx spesifik

aktivitesinde artış meydana gelmiştir. CAT aktivitesi ile MDA düzeyinde değişim olmadığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar *C. carpio*'da karaciğer dokusunda 0.23 ppm azinphosmethyl etkisinde 24 ve 72 saatte SOD aktivitesinin değişmediği, 48 ve 96 saat uygulamalar sonrası enzim aktivitesinin sırası ile 1.46- ve 2-kat arttığını bildirmişlerdir. CAT ve GPx aktiviteleri ile MDA miktarında değişim olmadığı belirtilmiştir (Oruç ve Üner, 2002).

Oruç ve ark. (Baskıda), 0.23 ppm azinphosmethyl uygulamasının *O. niloticus* ve *C. carpio*'da solungaç dokusunda SOD aktivitesini arttırdığını, enzim aktivitesindeki artışın *C. carpio*'da 53.3-kat olduğunu bildirmişlerdir. Beyin ve böbrek dokularında SOD aktivitesinde değişim olmamıştır. *O. niloticus*'da CAT değişmemiş, GPx aktivitesi beyin dokusunda azalmış, böbrekte artmıştır. *C. carpio*'da böbrek dokusunda CAT ve GPx aktiviteleri artmış, solungaç ve beyin dokularında kontrol düzeyinde kalmıştır.

Ksenobiyotiklerin toksisitesi etki altında kalan canlılarda farklılık gösterebilir (James ve ark., 1987). Bu yüzden potansiyel test türlerinin ksenobiyotiklere yanıtlarını değerlendirmek yararlıdır. Pestisitlerin balıklardaki etkilerinin araştırılması pestisitlerin insan sağlığına olan zararlı etkilerinin değerlendirilmesinde tanımlayıcı bir öneme sahiptir (Begum ve Vijayaraghavan, 1996). Akuatik ksenobiyotiklerin etkisinin biyolojik olarak izlenmesinde balık çalışmalarının kullanışlı oldukları kanıtlanmıştır (Pandey ve ark., 2001). Ancak farklı pestisitlerin etkisinde kalan tatlı su balıklarında oksidatif stres ile ilgili araştırmalar deniz balıkları ile yapılan çalışmalar kadar kapsamlı değildir.

Çevresel ksenobiyotiklerin toksik etki mekanizmasının tek bir spesifik işlem ile sınırlanmadığı, çok sayıda bölgenin ve mekanizmanın yer aldığı düşünülmektedir (Fatima ve ark., 2000). Ksenobiyotiklerin toksik etkileri ile ilgili çalışmalara göre biyoindikatör, organizmaların sağlık durumlarını değerlendirmek ve çevresel risklere karşı erken uyarı yanıtları elde etmek için kullanılırlar. Ancak antioksidan sistemin farklı türlerde geniş bireysel farklılıklar göstermeleri nedeniyle bu araştırmalar yetersiz kalmaktadır (Payne ve ark., 1984).

Pestisitlerin nörotoksisitelerini ve iyon iletimine etkilerini belirlemek üzere balıklarda AChE ve ATPaz enzim aktiviteleri incelenmiştir. *I. punctatus*'ta beyin,

solungaç, karaciğer ve kas dokuları ile plazmada chlorpyrifos, parathion ve S,S,S-tributyl phosphorotrithioate etkisinde AChE aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Derişimler 0.25 ppm chlorpyrifos, 0.25 ppm chlorpyrifos, 5.0 ppm S,S,S-tributyl phosphorotrithioate, 2.5 ppm parathion, 1.25 ppm parathion, 0.125 ppm chlorpyrifos +2.0 ppm S,S,S-tributyl phosphorotrithioate, 1.25 ppm parathion + 2.0 ppm S,S,S-tributyl phosphorotrithioate ve uygulama süreleri 0-384 saat olarak belirlenmiştir. S,S,S-tributyl phosphorotrithioate'ın 12 saatte beyinde enzim aktivitesinde % 20-35 oranında inhibisyona neden olduğu ve zayıf bir AChE inhibitörü olduğu bildirilmiştir. Diğer uygulama gruplarında 8 saatte beyin dokusunda AChE aktivitesi >%81 azalmıştır. Solungaç dokusunda tüm derişimlerde 8 saatte enzim aktivitesi >%81 inhibe olmuştur. Karaciğer dokusunda tüm derişimlerde 8 saatte >%96 AChE inhibisyonu bulunmuştur. S,S,S-tributyl phosphorotrithioate kas dokusunda beyin dokusundakine benzer şekilde etki göstermiştir. Diğer derişimlerde uygulamanın erken periyotlarında %60 inhibisyon bulunmuştur. Plazmada 8 saatte AChE aktivitesinde S,S,S-tributyl phosphorotrithioate etkisinde %56, diğer derişimlerde >%84 oranında inhibisyon meydana gelmiştir (Stratus ve Chambers, 1995).

Szegletes ve ark. (1995), 5 gün süre ile 2 ppm derişimde uygulanan metidathionun *C. carpio*'da kalp ve iskelet kası dokularında AChE'nin aktivitesi ile moleküler formları üzerine etkisini araştırmışlardır. Kontrol balıklarda AChE aktivitesinin kalpte kasa oranla daha yüksek olduğunu, pestisit etkisinde enzim aktivitesinde kas ve kalp dokularında sırasıyla %77 ve 92 düzeyinde inhibisyon meydana geldiği bildirilmiştir. Her iki dokuda da G₄, A₄ ve A₁₂ olmak üzere enzimin üç moleküler formu bulunmuştur. Metidathion uygulamasının enzimin moleküler formlarının dağılımını değiştirdiği, G₁ formu belirlenebilir düzeye gelirken daha büyük formların oranlarının azaldığı bildirilmiştir.

Procambarus clarkii'de fenitrothionun etkisinde kas dokusunda 24 saat uygulamadan sonra tüm derişimlerde AChE aktivitesinin inhibe olduğu, 4 ppb derişimde inhibisyonun %34 oranında meydana geldiği bildirilmiştir. 20 ppb derişimde 2 saat uygulamadan sonra enzim aktivitesinde %20, 48 saat uygulamadan sonra %47 oranında inhibisyon bildirilmiştir (Escartin ve Porte, 1996).

Sancho ve ark. (1997), fenitrothionun *Anguilla anguilla*'da beyin dokusunda AChE aktivitesinde doza ve süreye bağlı olarak inhibisyona neden olduğunu bildirmişlerdir. 0.02 ve 0.04 ppm derişimler için inhibisyon oranları sırası ile %44 ve 64 olarak bulunmuştur.

Oreochromis mossambicus'da beyin ve solungaç dokularında 96 saat 26 ppb chlorpyrifos etkisinde AChE aktivitesinde %88 oranında inhibisyon bildirilmiştir (Rao ve ark., 2003).

Tilapia mossambica'da kas, solungaç, karaciğer ve beyin dokularında 48 saat 0.09 ppm methyl parathion etkisinde ATPaz aktivitesinde sırasıyla %10, 16, 14 ve 13 oranlarında inhibisyon belirlenmiştir (Rao ve Rao, 1984).

A. anguilla'da solungaç dokusunda 0.02 ppm fenitrothion etkisinde 56 saat uygulama sonrası $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaz aktivitesinde %75 inhibisyon bulunmuştur (Sancho ve ark., 1997). Aynı çalışmada 96 saat uygulama sonrası Mg^{+2} ve total ATPaz aktivitelerinde sırasıyla %63 ve 62 inhibisyon bildirilmiştir.

Das ve Mukherjee (2000), 15, 30 ve 45 gün 1.12, 0.22 ppm quinalphos etkisinde *Labeo rohita*'da beyin, karaciğer ve böbrek dokularında ATPaz, beyin dokusunda AChE enzim aktiviteleri, kas dokusunda protein miktarındaki değişimleri araştırmışlardır. ATPaz aktivitesinin tüm uygulama sürelerinde ve derişimlerde azaldığı, AChE aktivitesinin özellikle 45 gün 1.12 ppm derişimde azalma gösterdiği bildirilmiştir. 15 gün 0.22 ve 1.12 ppm derişimlerde protein miktarında kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz düzeyde azalma meydana gelirken, 30. ve 45. günlerde protein miktarının önemli düzeyde azaldığı bildirilmiştir.

Tilapia zilli, *C. carpio* ve *O. niloticus*'ta karaciğer dokusunda 24, 48, 72 ve 96 saat süreler ile 0.03 ve 0.05 ppm azinphosmethyl etkisinde $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi ile MDA miktarındaki değişimler araştırılmıştır. *T. zillii*'de tüm uygulama sürelerinde ve derişimlerde $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPaz aktivitesi inhibe olmuş buna karşılık MDA miktarı artmıştır. *C. carpio*'da enzim aktivitesinde ve MDA miktarında değişim olmamıştır. *O. niloticus*'ta enzim aktivitesinde 24 ve 48 saat pestisit uygulamasından sonra değişim olmadığı, 72 ve 96 saat sonra enzim aktivitesinin azaldığı, fakat MDA miktarının değişmediği bildirilmiştir (Oruç ve ark., 2002).

Organofosforlu pestisitlerin balıklarda protein miktarını etkiledikleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Dört hafta süre ile 109.5 ppm phosphamidon etkisinde bırakılan *Puntius conchoni*'da kanda ve karaciğer dokusunda protein miktarında ilk hafta %53 oranında artış bulunmuş ve pestisit uygulaması sonlandırıldıktan sonra bile hiperproteinemi devam etmiştir. Kas dokusunda protein miktarında ilk hafta %30 oranında artış meydana gelmiş, uygulamanın ilerleyen dönemlerinde protein miktarı önemli düzeyde azalmıştır (Gill ve ark., 1990).

Begum ve Vijayaraghavan (1996), 24, 48, 96 ve 192 saat 21.66 ppm dimethoate etkisinde *Clarias batrachus*'ta kas dokusunda total protein miktarının önemli derecede azaldığı, maksimum azalmanın 48 saat uygulama sonrasında belirlendiği, 96 ve 192 saat uygulamalardan sonra protein miktarında daha düşük düzeyde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Sancho ve ark. (1999), fenitrothion etkisinde *A. anguilla*'da solungaç dokusunda protein miktarında azalma belirlemişlerdir. Protein miktarında en yüksek azalma pestisit uygulamasından 96 saat sonra %65 oranında meydana gelmiş ve uygulama sonlandırıldıktan sonra da devam etmiştir.

Diazinon etkisinde balıklarda meydana gelen histopatolojik, hematolojik ve enzimatik değişiklikler araştırılmıştır.

Diazinonun LC₅₀ değerinin (20 ppm) 1/2, 1 ve 2 katları 24, 48 ve 96 süreyle uygulanmış, *Tilapia nilotica*'da bağırsak dokusunda meydana gelen yapısal değişimler araştırılmıştır. Mitokondride kristalarda dejenerasyon, granüllü endoplazmik retikulumda azalma buna karşılık granülsüz endoplazmik retikulumda artma, golgi komplekslerinde sisternada genişleme ve sitoplazmada lizozomların sayısında artış meydana geldiği bildirilmiş, bu değişikliklerin oluş sıklığının pestisit konsantrasyonu ile orantılı olduğu belirtilmiştir (El-Elaimy ve ark., 1990).

Sakr ve Gabr (1992), 24, 48 ve 72 saat 10, 20 ve 30 ppm diazinon etkisinde *T. nilotica*'da iskelet kası hücrelerinde sarkoplazmik retikulumda büyüme, sitoplazmik vakuol ve miyofibrillerde fragmentasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Dutta ve ark. (1997), 24 saat 15, 30, 45, 60 ve 75 ppb diazinon etkisinde *Lepomis macrochirus*'ta böbrek ve dalakta makrofajların miktarında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Dört gün 0.056 ppm diazinon uygulaması *A. anguilla*'da karaciğer ve kas dokularında pestisit akümülayonu ile sonuçlanmıştır. Dokularda pestisit konsantrasyonunun uygulamadan sonra dereceli olarak arttığı ve biyokonsantrasyon faktörlerinin kas>karaciğer şeklinde olduğu bildirilmiştir. Kas dokusunda akümülayon oranının yüksek olması diazinonun dış epidermisten absorpsiyonu sonrası dermis yolu ile kas dokusuna alınmasıyla açıklanmıştır (Sancho ve ark., 1993).

C. carpio'da 96 saat 32.5 ppm diazinon uygulaması eritrosit sayısında, hematokrit değerinde ve hemoglobin miktarında kontrole göre önemli oranda azalmaya neden olmuştur (Svoboda ve ark., 2001).

Ansari ve ark. (1987), 24-288 saat süresince 0.26, 0.52, 1.04 ve 2.08 ppm derişimlerde uygulanan diazinonun *Brachydanio rerio*'da AChE, asit ve alkalin fosfataz enzim aktivitelerini zamana bağı olarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir. *Poecilia reticulata*'da beyin dokusunda 48 saat 0.1 ve 0.2 ppm diazinon etkisinde AChE aktivitesinde sırasıyla %60 ve 73; 0.4 ve 2 ppm diazinon etkisinde *B. rerio*'da sırasıyla %45 ve 80 inhibisyon bildirilmiştir (Keizer ve ark., 1991).

O. mykiss, *P. reticulata*, *B. rerio* ve *C. carpio*'da diazinon toksisitesindeki farklılıkları açıklamak üzere beyin dokusunda AChE'nin duyarlılığı ile birlikte diazinonun *in vitro* hepatik metabolizması araştırılmıştır. Dört tür arasında beyin AChE'nin spesifik aktivitesinin benzer olmasına karşın, diazokson ile inhibisyon açısından önemli derecede farklılık gösterdikleri bulunmuştur. En duyarlı AChE 0.2 µM IC₅₀ değeri ile *C. carpio*'da bulunmuştur. *O. mykiss*, *P. reticulata* ve *B. rerio* için IC₅₀ değerleri 2.5, 7.5 ve 20 µM olarak verilmiştir. *O. mykiss*, *P. reticulata* ve *B. rerio*'da hepatik S-13 fraksiyonunda diazinonun metabolitleri olarak diazokson ve pirimidinol, *C. carpio*'da sadece pirimidinol belirlenmiştir (Keizer ve ark., 1995).

Pan ve Dutta (1998), 24 saat süre ile 90, 180, 270, 360 ve 450 ppb diazinon etkisinde *Micropterus salmoides*'te beyin dokusunda AChE aktivitesinde doza bağı olarak azalma meydana geldiğini bildirmişler ve yüzde inhibisyon değerlerini sırasıyla %48.2, 63.4, 72.6, 82.1 ve 91.4 olarak bulmuşlardır.

Diazinon etkisinin yalnız AChE inhibisyonuna bağlı olmadığı, peroksidatif hasar veya iyon iletimindeki değişikliklerin balıklarda toksisiteye neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, farklı subletal derişimler ve uygulama sürelerinde diazinon toksisitesine *C. carpio*'da dokuya özgü yanıtlar, antioksidan enzim aktivitelerindeki derişimler ve lipid perokidasyonunun göstergesi olan MDA miktarı ile birlikte nörotoksosite indikatörleri olarak AChE ve Na⁺K⁺-ATPaz aktivitelerindeki derişimler incelenerek belirlenmiştir.

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

Adenozin 5' trifosfat (ATP, Sigma): $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$

Asetik Asit (Merck): CH_3COOH

Asetilkolin İyodür (Sigma)

Bakır Sülfat (Sigma): $CuSO_4 \cdot 5H_2O$

di-Potasyum Hidrojen Fosfat (Merck): K_2HPO_4

di-Sodyum Hidrojen Fosfat (Merck) : $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$

Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA, Sigma)

Etopropazin (Sigma): $C_{19}H_{24}N_2S \cdot HCl$

Folin-Ciocalteu Fenol Ayracı (Sigma)

Glutasyon (GSH, Sigma): $C_{10}H_{17}N_3O_6S$

Glutasyon Redüktaz (GR, Sigma)

Hidrojen Peroksit (Merck): H_2O_2

Ksantin (Merck): $C_5H_4N_4O_2$

Ksantin Oksidaz (XOD, Sigma)

L-Askorbik Asit (Merck): $C_6H_8O_6$

Lauril Sülfat (SDS, Sigma): $C_{12}H_{25}O_4SNa$

Magnezyum Klorür (Sigma): $MgCl_2$

Piridin (Merck): C_5H_5N

p-İyodonitrotetrazolyum (INT, Sigma): $C_{19}H_{13}ClIN_5O_2$

Potasyum Dihidrojen Fosfat (Merck): KH_2PO_4

Potasyum Klorür (Merck): KCl

Sodyum Dihidrojen Fosfat (Merck): $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$

Sodyum Hidroksit (Merck): $NaOH$

Sodyum Karbonat (Merck): Na_2CO_3

Sodyum Klorür (Merck): $NaCl$

Sodyum Potasyum Tartarat (Sigma)

Sükroz (Sigma): $O_{12}H_{22}O_{11}$

t-Butil Hidroperoksit (Sigma): $C_4H_{10}O_2$

Tris Baz (Sigma): $C_4H_{11}NO_3$

Tris Hidroklorit (Tris HCl, Sigma): $C_4H_{11}NO_3HCl$

Yumurta Albumini (British. Drug Corp.)

1-Butanol (Merck): $CH_3(CH_2)_3OH$

1, 1, 3, 3 Tetrametoksipropan (Sigma): $C_7H_{16}O_4$

2-Tiyobarbitürik Asit (TBA, Merck) : $C_4H_4N_2O_2S$

3-(Sikloheksilamino)-1-Propan Sülfanik Asit (CAPS, Sigma): $C_9H_{19}NO_3S$

5-5'-Ditiyo-bis (2- Nitrobenzoik Asit) (DTNB, Sigma): $C_{14}H_8N_2O_8S_2$

β -Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat β -NADPH, Sigma): $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$

3.1.2. Kullanılan Aletler

Analitik Terazı (Sartorius Analytic A200s)

Benmari (Nüve BM 101)

Buz Makinası (Scotsman AF 20)

Distile Su Cihazı (Kotterman 1034)

Homojenizatör (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T 25)

Otomatik Pipet (Gillman)

pH Metre (Hanna Instruments HI 8314)

pH Metre (Hanna Instruments 11-pH meter)

Santrifüj (Juan MR 23i)

Santrifüj (Hettich EBA 8S)

Terazi (Sartorius BP 310 S)

UV Spektrofotometre (Shimadzu UV mini 1240)

3.1.3. Deney Materyali

Araştırma materyali olarak kullanılan ergin *C. carpio* Ç.Ü. Su Ürünleri Fakültesi yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuvar koşullarına adaptasyonları

sağlanmıştır. Akvaryumlar dinlendirilmiş musluk suyu ile doldurulmuş ve merkezi sistem ile havalandırılmıştır. Laboratuarda 12 saat aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Suyun fiziko-kimyasal özellikleri, sıcaklık 20 ± 2 °C, pH 8.2, alkalinite 206.095 ppm CaCO_3 ve sertlik 268 ppm CaCO_3 olarak belirlenmiştir. Balıklar günde iki kez ağırlıklarının %3'ü kadar hazır yem (Pınar Yem, Türkiye) ile beslenmişler ve denemelerde 87.67 ± 31.39 g ağırlıkta ve 17.62 ± 2.26 cm boydaki bireyler kullanılmıştır. Denemeler kontrollü olarak yürütülmüştür. Pestisit olarak diazinon [(O, O-diethyl O-[6-methyl-2-(1-methylethyl)-4-pyrimidinyl] phosphorothioate), Basudin 60 EM, Syngenta, 630 g/L] uygulanmıştır.

3.2. Metod

Denemeler 140 L dinlendirilmiş musluk suyu içeren ve içerisinde 12 adet balık bulunan 4 adet akvaryum ile yürütülmüştür. Akvaryumlardan birisi kontrol akvaryumu olarak seçilmiş, diğer akvaryumlara sırasıyla diazinonun 96 saat LC_{50} değeri olan 0.072 ppb'in (Dembele ve ark., 2000) %5, %25 ve %50 değerleri olan 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb dozlar 5, 15 ve 30 gün sürelerle uygulanmıştır. Buharlaşma ve adsorbsiyon gibi nedenlerle pestisit derişiminde meydana gelebilecek değışimleri engellemek amacıyla akvaryum suyunun 2/3'ü 24 saat aralıklarla değıştirilmiştir (A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1980).

Deneme süreleri sonunda her akvaryumdan 4 balık disekte edilerek solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokuları alınmıştır. Dokular soğuk fizyolojik tuz çözeltisi (%0.59 NaCl) ile yıkandıktan sonra analizlere kadar -70 °C'de saklanmışlardır.

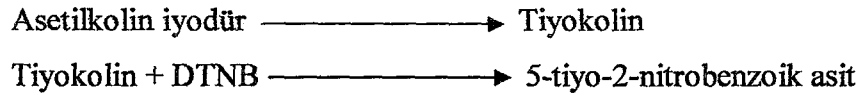
Analizler için solungaç, kas ve sindirim bezi dokuları 1/5 (w/v), böbrek dokusu 1/10 (w/v) olacak şekilde 0.25 M pH 7.4 sükroz tamponda, cam-teflon homojenizatör (Janke&Kunkel Ultra-Turrax T 25) ile 10000 rpm'de 1.5 dakika homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar $+4$ °C'de 10000 rpm'de (Juan MR 23i) 30 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant SOD, GPx, CAT, AChE, Na^+K^+ -ATPaz enzim aktiviteleri ile MDA ve protein düzeylerinin spektrofotometrik (Shimadzu UV mini 1240) yöntemlerle belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.2.1. Analiz Yöntemleri

3.2.1.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi

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

Kolinesteraz



Ayırıcılar

1. 0.1 M Na₂K Fosfat Tamponu (pH 8.0)
2. 0.1 M Na, K Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. 0.01 M DTNB
4. 8.52×10^{-3} M Etopropazin (BChE inhibitörü, günlük olarak hazırlanır)
5. 0.015 M Asetilkolinyodür (günlük olarak hazırlanır)

Yöntem

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

Çizelge 3.1. Asetilkolinesteraz Yöntemi

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

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

Hesaplama

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

OD₅: 5. dakikadaki absorbans,

OD₁: 1. dakikadaki absorbans,

V_t: Toplam hacim,

V₀: Örnek hacmi.

3.2.1.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Yöntemi

Sodyum potasyum adenozin trifosfataz enzim aktivitesi inkübasyon sırasında ortama eklenen 3 mM disodyum ATP varlığında miligram protein için bir saatte açığa çıkan inorganik fosfatın ölçülmesi prensibine dayanmaktadır.

İnkübasyon ortamına eklenen adenozin 5' trifosfattan açığa çıkan inorganik fosfat ölçümü Ames ve Dubin (1956) tarafından önerilen yöntemle yapılmıştır. Yöntem ATP'den ayrılan inorganik fosfatın askorbik asit ve fosfomolibdat ile kompleks oluşturması ilkesine dayanmaktadır.

Ayırıcılar**a) İnkübasyon ortamının hazırlanmasında kullanılan ayırıcılar**

1. 500 mM NaCl
2. 25 mM KCl
3. 30 mM MgCl₂
4. 125 mM Tris (pH 7.4)
5. 117.9 mM (pH 7.4)
6. 75 mM Adenozin 5' trifosfat

b) İnorganik fosfat ölçümünde kullanılan ayırıcılar

7. %10 Askorbik asit çözeltisi (+4 °C'de 1 ay dayanıklıdır)
8. Molibdik asit çözeltisi
9. Askorbik asit-Molibdat ayırıcı
10. Standart inorganik fosfat çözeltisi

0.2 mM potasyum dihidrojen fosfat stok çözeltisi hazırlanır. Bu stok standardın içine %0.1'lik kloroform konduktan sonra 0.2, 0.1, 0.05, 0.02 ve 0.01 mM olacak şekilde çalışma standardı hazırlanarak eğri çiziminde kullanılır.

Yöntem

Sodyum potasyum adenozin trifosfataz enzim aktivitesini belirlemek üzere Çizelge 3.2.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Yöntemi

Çözeltiler	Örnek	Örnek Körü	ATP Körü
NaCl	0.5	0.5	0.5
KCl	0.5	0.5	0.5
MgCl ₂	0.5	0.5	0.5
EDTA	0.1	0.1	0.1
125 mM Tris	0.6	-	0.6
117.9 mM Tris	-	0.7	-
Örnek	0.2	0.2	0.2 (Kaynamış)
Çalkalanır ve 5 dakika 37 °C'de su banyosunda inkübe edilir.			
ATP	0.1	-	0.1

Otuz dakika 37°C su banyosunda inkübe edilir. İnkübasyondan hemen sonra tüpler buz banyosuna alınır ve 5-10 dakika boyunca bekletilerek reaksiyon durdurulur. Daha sonra inorganik fosfat ölçümü yapılır.

İnorganik Fosfat Ölçümü

Buzda bekletilen ve içeriği 2.5 mL olan tüplere 1.2 mL molibdik asit ayırıcı eklenip 10 dakika bekletildikten sonra saf suya karşı 390 nm dalga boyunda ölçülür.

Hesaplama

Örnek körü ile ATP körünün absorpsanları toplamı örneğin absorpsan değerinden çıkarılır ve elde edilen değere karşılık gelen inorganik fosfat miktarı standart dihidrojen fosfat eğrisinden değerlendirilir.

3.2.1.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan endojen ve eksojen kaynaklı toksik $O_2^{\cdot-}$ 'nin, H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırmaktadır. Ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikalleri 2-[4-iyodofenil]-3[4-nitrofenol]-5-feniltetrazoliyum klorid ile kırmızı renkli bir kompleks oluşturur. Eğer ortamda SOD enzimi varsa $O_2^{\cdot-}$ 'ni ortamdan uzaklaştırmak için formazon oluşumu inhibe olur. Süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin ölçümü 505 nm'de formazon oluşumunun yüzde (%) inhibisyonu ile ölçülür (McCord ve Fridovich, 1969).

Ayırıcılar

1. CAPS Tamponu (pH 10.2)
2. Miksed Substrat
3. 80 U/L Ksantin Oksidaz
4. 0.01 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)

Yöntem

Süperoksit dismutaz enzim aktivitesini ölçmek üzere Çizelge 3.3.'de gösterilen işlemler yapılır.

Çizelge 3.3. Süperoksit Dismutaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Örnek	-	25
Fosfat Tamponu	25	-
Miksed Substrat	850	850
İyice çalkalanır.		
XOD	125	125

Tekrar çalkalandıktan 30 saniye sonra 37 °C'de, 505 nm dalga boyunda havaya karşı başlangıç absorbansı (A_1) 0. dakika okunur. Son absorbans (A_2) 3 dakika sonra okunur.

Hesaplama

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

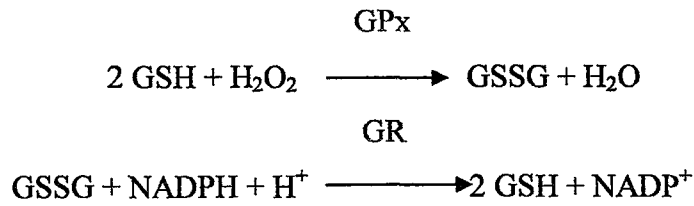
$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - \frac{\Delta A/\text{dakika} \times 100}{\Delta A/\text{dakika}_{\text{çalışma kördü}}}$$

Elde edilen % İnhibisyon değeri standart eğriden değerlendirilir.

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

3.2.1.4. Glutatyon Peroksidaz Yöntemi

Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 tarafından GSH'nin GSSG'ye yükseltgenmesini katalizler. Hidrojen peroksit olarak t-butil hidroperoksitin bulunduğu ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, GR ve NADPH yardımıyla GSH'ye indirgenir. Glutatyon peroksidaz aktivitesi, NADPH'nin NADP^{+} 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunması ile ölçülür (Beutler, 1984).

**Ayırıcılar**

1. Tris Tampon (pH 8.0)
2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. 7 mM t-butil hidroperoksit

Yöntem

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçmek üzere Çizelge 3.4.'te gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.4. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)
Saf su	660
Tris Tamponu	100
GSH	25
GR	100
NADPH	100
Örnek	10
37°C'de 10 dakika inkübe edilir.	
t-butil hidroperoksit	10

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

Hesaplama

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

ΔOD : Zamana göre absorbanans değişimi,

t: Zaman,

V_t : Toplam hacim,

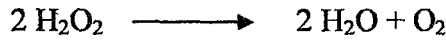
V_0 : Örnek hacmi.

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

3.2.1.5. Katalaz Yöntemi

Katalaz, H_2O_2 'nin yıkımını katalizler. Hidrojen peroksitin katalaz tarafından yıkım hızı, H_2O_2 'nin 230 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülebilir (Beutler, 1984).

CAT



Ayırıcılar

1. Tris Tamponu (pH 8.0)
2. 1 M Fosfat Tamponu (pH 7.0)
3. 10 mM H_2O_2

Yöntem

Katalaz enzim aktivitesini belirlemek üzere Çizelge 3.5.'te gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.5. Katalaz Yöntemi

Çözeltiler	Kör (µL)	Örnek (µL)
Tris Tamponu	50	50
H_2O_2	-	900
H_2O	930	30
37 °C'de 10 dakika inkübe edilir.		
Örnek	20	20

Kör ve örneğin absorpsansı 230 nm dalga boyunda 0., 2.5. ve 5. dakikalarda ölçülür.

Hesaplama

$$CAT \text{ Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta OD \times V_t}{0.071 \times V_0}$$

ΔOD : Zamana göre absorpsans değişimi,

V_t : Toplam hacim,

V_0 : Örnek hacmi,

0.071: H_2O_2 'nin 230 nm dalga boyundaki mM ekstinksiyon katsayısı.

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

3.2.1.6. Malondialdehit Yöntemi

Malondialdehit lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olup, lipidlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Malondialdehit, aerobik şartlarda, pH 3.4'te TBA ile 95 °C'de 30 dakika inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşur. Bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Ohkawa ve ark., 1979).

Ayırıcılar

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

Standart Eğri Çizimi

Günlük standart: Stok standarttan 6.6 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanır. 400 nmol/mL'lik günlük standart hazırlanmış olur. Daha sonra 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL'lik çalışma standartları hazırlanır ve standart eğri çizimi için Çizelge 3.6.'da gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.6. Malondialdehit Standart Eğri Çizimi

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

Kuvvetli şekilde vortekslenir ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

Üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de absorbanşı okunur.

Yöntem

Malondialdehit miktarını belirlemek üzere Çizelge 3.7.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.7. Malondialdehit Yöntemi

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

Kuvvetli şekilde vortekslenir ve 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.

Üstteki organik kısım alınıp 532 nm dalga boyunda verdiği absorbanşlar kaydedilir.

Elde edilen sonuçlar standart eğriden değerlendirilir.

3.2.1.7. Protein Yöntemi

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

Ayıraçlar

1. Alkali Na_2CO_3 çözeltisi
2. Bakır sülfat-Sodyum potasyum tartarat çözeltisi
%1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
%2 Na-K tartarat
Kullanılacağı zaman bu çözeltiler eşit hacimde karıştırılarak hazırlanır.
3. Alkali Çözelti (günlük olarak hazırlanır): 50 mL alkali Na_2CO_3 çözeltisi 1 ve 2 numaralı çözelti ile karıştırılarak hazırlanır.
4. Folin-Ciocalteu Ayıracı: 1 mL Folin-Ciocalteu, 1.5 mL saf su ile karıştırılarak istenilen hacimde hazırlanır.

Standart Eğri Çizimi

Yumurta albumini kullanılarak 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimde stok protein çözeltisi hazırlanır. Çalışma için bu çözeltiden 100, 200, 300, 400 ve 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ derişimlerde standartlar hazırlanır. Standart eğri çizimi için Çizelge 3.8.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.8. Protein Standart Eğrisinin Çizimi

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

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

Yöntem

Protein miktarını belirlemek üzere Çizelge 3.9.'de gösterilen işlemler uygulanır.

Çizelge 3.9. Protein Yöntemi

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

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

3.2.2. İstatistiksel Analiz

Veriler Artimetik ortalama $\pm$ Standart hata olarak verilmiştir. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılığı belirlemek üzere varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Kontrol ile uygulama gruplarının aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılığı belirlemek üzere LSD testi uygulanmış, analizlerde SPSS paket programı (SPSS 10.0 Paket Programı) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Diazinonun farklı subletal derişimlerinin etkisinde *C. carpio*'da solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında AChE, Na⁺K⁺-ATPaz, SOD, GPx ve CAT enzim aktiviteleri ile MDA ve protein miktarları belirlenerek çizelge ve şekiller halinde sunulmuştur.

4.1. Solungaç Dokusu

4.1.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkisileri

C. carpio'da 5 ve 15 gün sürelerle diazinon uygulamalarından sonra solungaç dokusunda asetilkolinesteraz aktivitesinde önemli bir değişim bulunamamıştır ($p>0.05$). Bununla beraber 30 gün diazinon uygulaması yalnızca en yüksek ve en düşük derişimlerde aktiviteyi sırasıyla %32.5 ve %40 azaltmış ($p<0.01$) diğer derişimin enzim aktivitesine etkisi olmamıştır (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.1.).

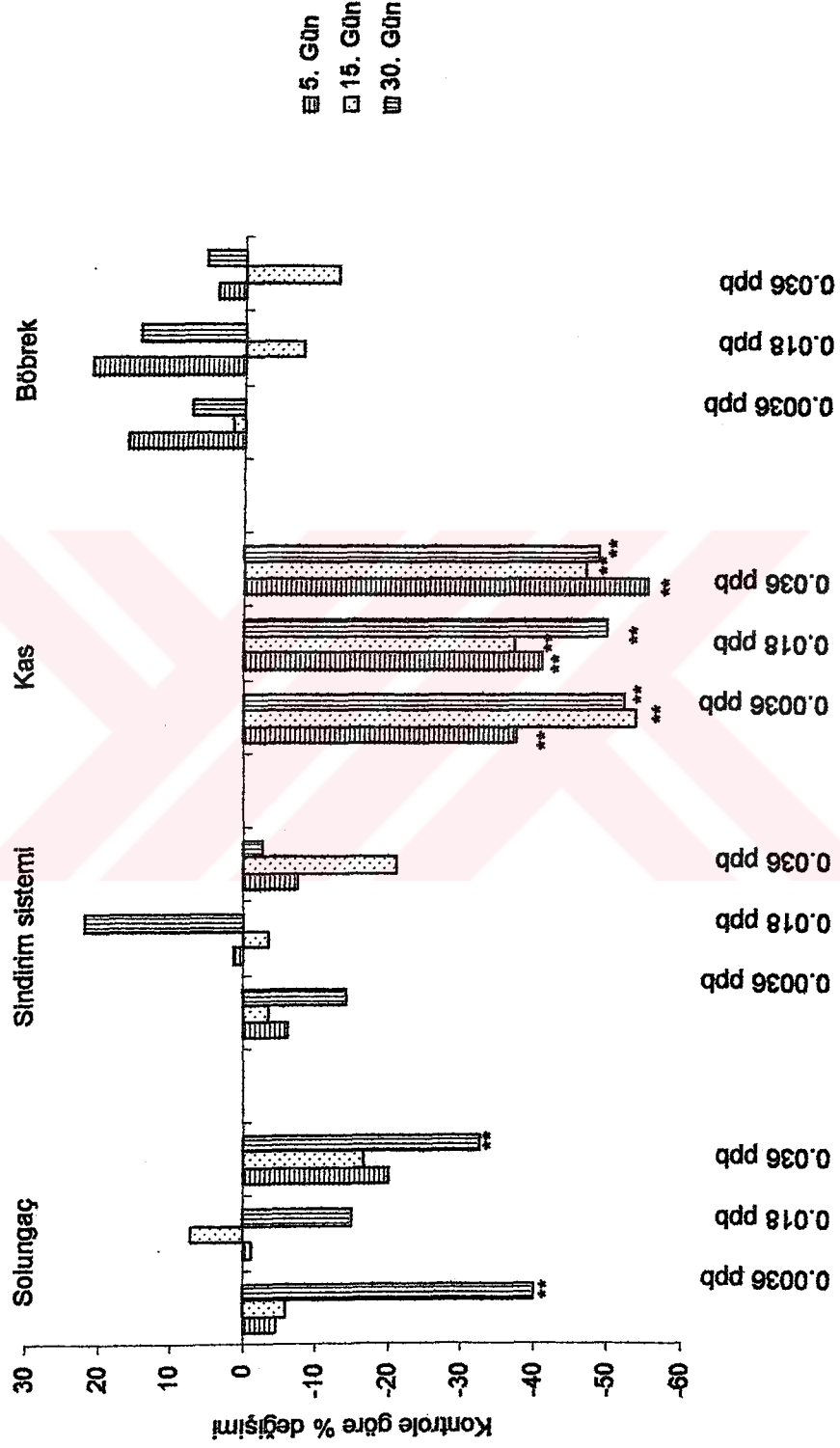
Çizelge 4.1. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda AChE aktivitesine (U/mg protein) etkisi.

Derişim (ppb)	AChE Aktivitesi (U/ mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0085±0.0005a	0.0085±0.0007ab	0.0080±0.0005a
0.0036	0.0081±0.0011a	0.0080±0.0005ab	0.0048±0.0002bc*
0.018	0.0084±0.0009a	0.0091±0.0004a	0.0068±0.0009ac
0.036	0.0068±0.0006a	0.0071±0.0002b	0.0054±0.0004c*

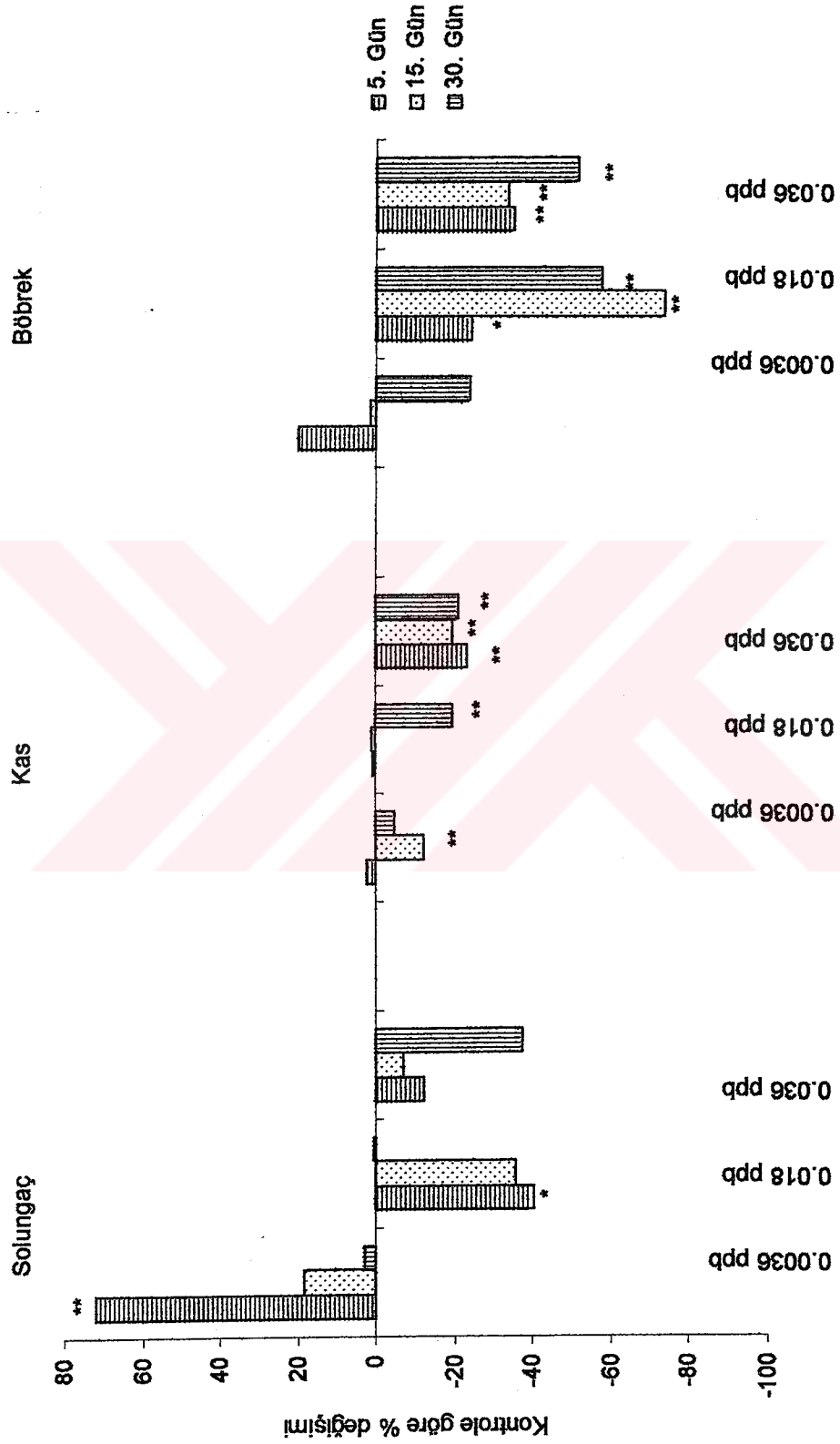
Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.1.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Aktivitesine Etkileri

Pestisit etkisine 5 gün süreyle bırakılan *C. carpio* örneklerinde 0.036 ppb diazinon etkisinde enzim aktivitesi kontrol düzeyinde kalırken, 0.0036 ppb diazinon etkisinde %72.19 düzeyinde artış ($p<0.01$), 0.018 ppb diazinon etkisinde %40.38 düzeyinde düşüş ($p<0.05$) bulunmuştur (Şekil 4.2. ve Çizelge 4.2.).



Şekil 4.1. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında AChE spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.2. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, kas ve böbrek dokularında Na^+K^+ -ATPaz spesifik aktivitesinin ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein/saat) kontrole göre % değişimi. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda Na⁺K⁺-ATPaz (μmol/mg protein/saat) aktivitesine etkisi

Derişim (ppb)	Na ⁺ K ⁺ -ATPaz Aktivitesi (μmo/ mg protein/saat)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	32.9052±6.5714a	26.0312±2.3702ab	26.0358±0.7273a
0.0036	49.7167±7.2902b*	30.8012±3.2680a	26.7579±1.1957a
0.018	19.6179±4.5762c	16.7340±3.5979b	26.1993±1.2699a
0.036	28.8850±4.0656ac	24.2219±2.0766ab	16.2876±1.7550a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri

Diazinon etkisinde 5 gün süreyle bırakılan balıklarda 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb derişimlerin etkisinde kontrole göre sırasıyla %102.17, %148.37 ve %135.87 artma varken (p<0.01), diğer uygulama periyotlarında enzim aktivitesinin değişmediği bulunmuştur (p>0.05, Çizelge 4.3. ve Şekil 4.3.).

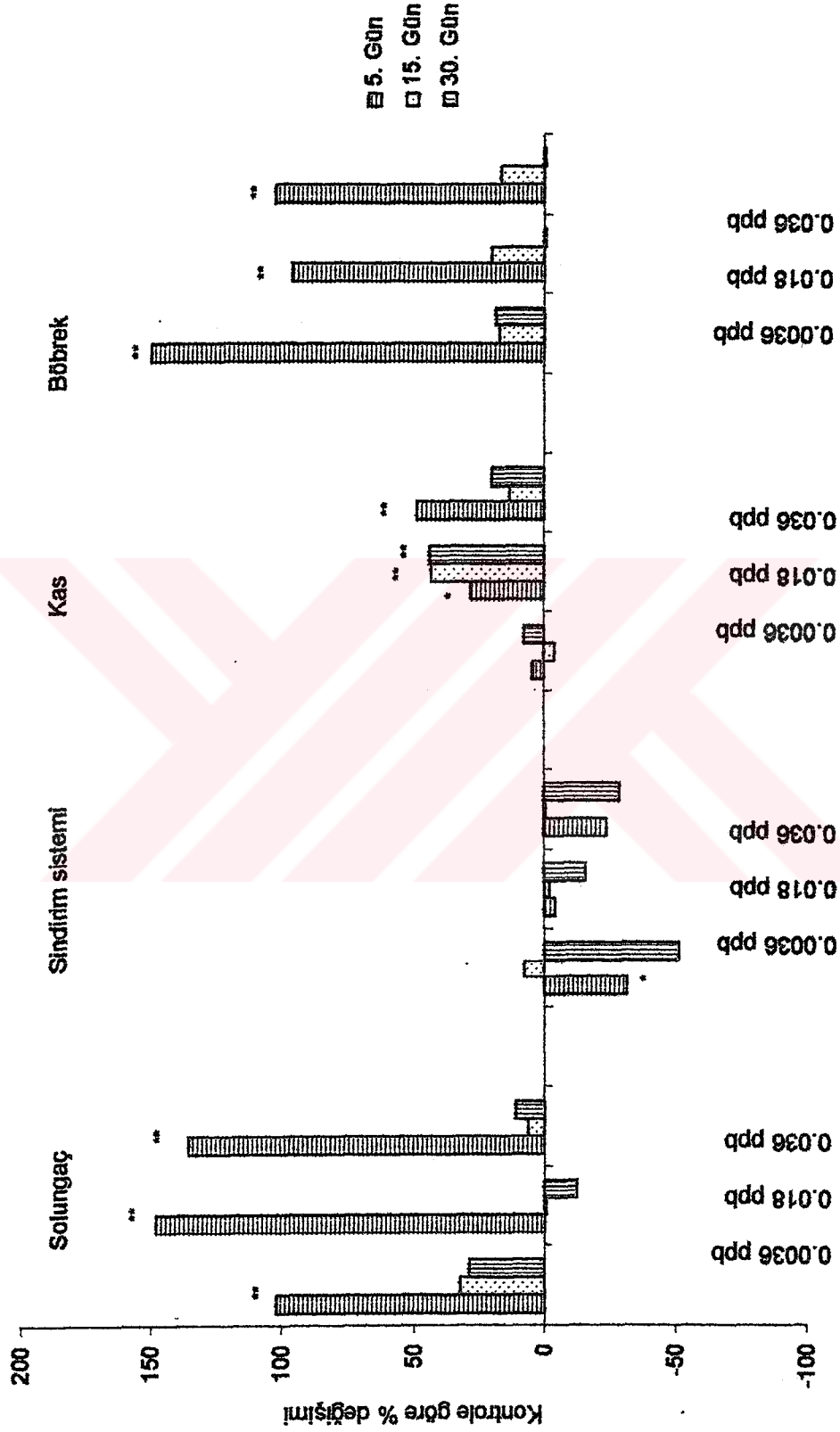
Çizelge 4.3. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda SOD (U/mg protein) aktivitesine etkisi.

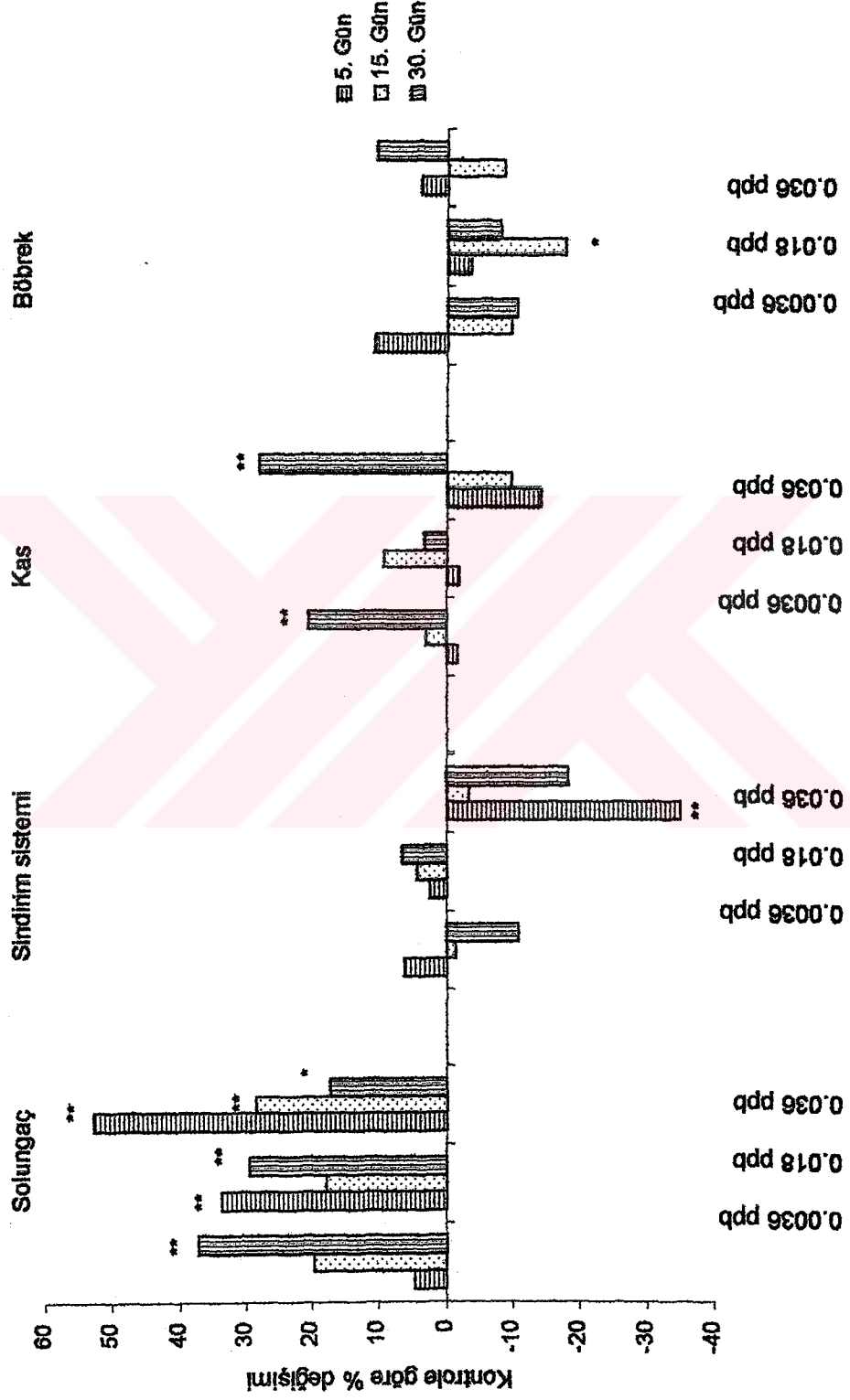
Derişim (ppb)	SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0184±0.0024a	0.0244±0.0045a	0.0184±0.0027a
0.0036	0.0372±0.0047b*	0.0322±0.0030a	0.0236±0.0032a
0.018	0.0457±0.0037b*	0.0241±0.0017a	0.0161±0.0021a
0.036	0.0434±0.0025b*	0.0259±0.0019a	0.0204±0.0028a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri

Beş gün süreyle diazinon uygulamasından sonra 0.0036 ppb derişim etkisinde enzim aktivitesi değişmediği (p>0.05), 0.018 ppb ve 0.036 ppb derişimlerin etkisinde aktivitenin sırasıyla %33.55 ve %52.96 arttığı bulunmuştur (p<0.01, Şekil 4.4. ve Çizelge 4.4.). On beş gün süreyle diazinon uygulamasından sonra sadece en yüksek derişimin aktiviteyi %28.70 artırırken, 30 gün diazinon uygulamasından sonra ise tüm derişimlerin aktivitede sırasıyla %37.02, %29.56 ve %17.27 artışa neden oldukları belirlenmiştir (p<0.01).





Şekil 4.4. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında GPx spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi. * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.4. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	GPx Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.1875±0.0068a	0.1847±0.0123a	0.2223±0.0051a
0.0036	0.1962±0.0095a	0.2212±0.0164ab	0.3046±0.0167b*
0.018	0.2504±0.0207b*	0.2119±0.0060ab	0.2880±0.0190bc*
0.036	0.2868±0.0041b*	0.2377±0.0142b*	0.2607±0.0142c

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.5. Katalaz Aktivitesine Etkisine Etkileri

Bu çalışmada diazinonun denenen derişimlerinde ve uygulama periyotlarında sadece 0.018 ppb derişim etkisinde 5 günlük uygulamadan sonra enzim aktivitesinde kontrole göre %51.09 artış bulunmuştur (p<0.01, Çizelge 4.5. ve Şekil 4.5.).

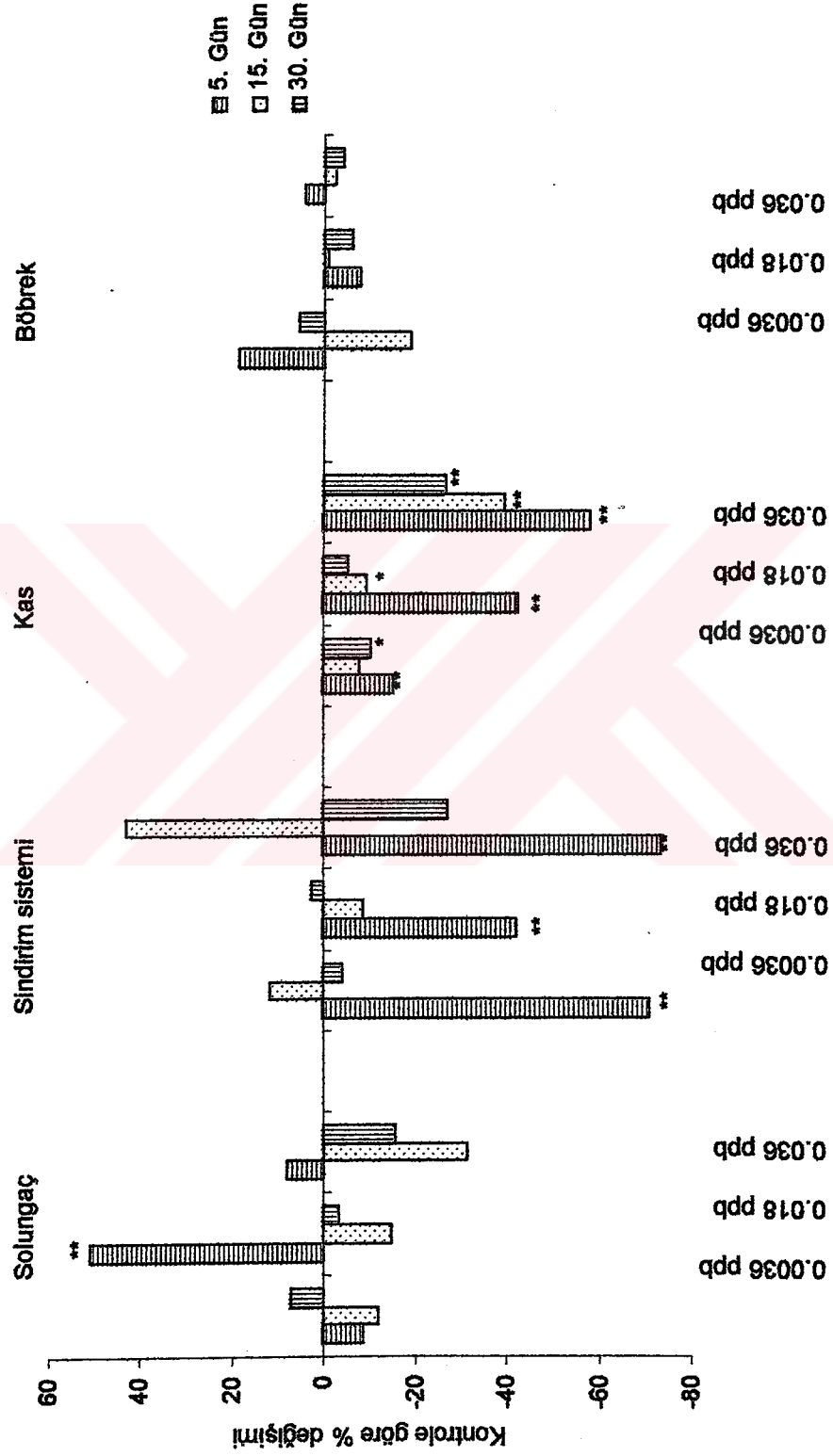
Çizelge 4.5. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	6.8423±0.3798a	5.6826±0.2453a	7.1684±0.3602a
0.0036	6.2541±0.4337a	5.0044±0.3136a	7.6766±0.8401a
0.018	10.5443±1.6055b*	4.8526±0.3179a	6.9512±0.6930a
0.036	7.3893±0.4454a	3.9104±0.3025a	6.0458±0.5229a

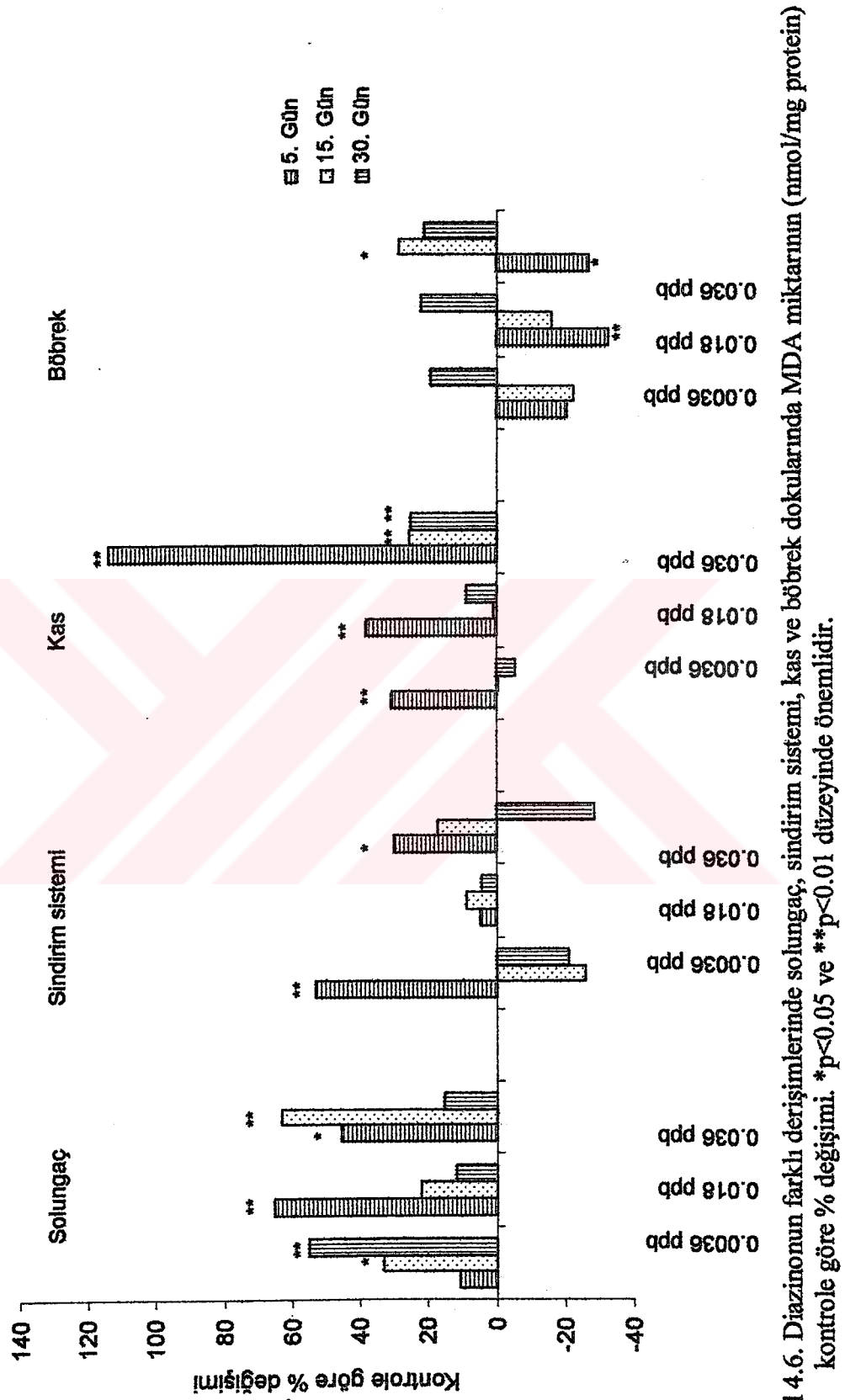
Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.6. Malondialdehit Miktarına Etkileri

Beş gün süreyle 0.0036 ppb diazinon etkisinde *C. carpio*'da solungaç dokusunda malondialdehid miktarı değişmezken (p>0.05), 15. ve 30. günlerde kontrole göre %32.91 ve %55.05 oranlarında artmıştır (p>0.05; Şekil 4.6. ve Çizelge 4.6.). Diazinon 0.018 ppb derişimde uygulamanın 5. gününde (p<0.01), 0.036 ppb derişim etkisinde 5. ve 15. günlerde (p<0.01) MDA miktarı kontrol grubundan ve 0.0036 ppb derişim etkisinden daha fazla bulunmuştur (p<0.01). İki derişimde de 30. günde MDA miktarı değişmemiştir (p>0.05). Malondialdehid miktarındaki artışlar kontrole göre 0.018 ppb etkisinde 5. gün %64.71; 0.036 ppb etkisinde 5. gün %45.58, 15. gün %63.06 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında CAT spesifik aktivitesinin (U/mg protein) kontrole göre % değişimi. * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.



Çizelge 4.6. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	MDA Miktarı (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.8164±0.0394a	1.2960±0.0312a	1.1451±0.0614a
0.0036	0.9053±0.0752ac	1.7225±0.1102b	1.7755±0.2739b*
0.018	1.3447±0.1247bc*	1.5847±0.1914ab	1.2783±0.0983a
0.036	1.1885±0.0629c	2.1133±0.0906c*	1.3204±0.1635a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

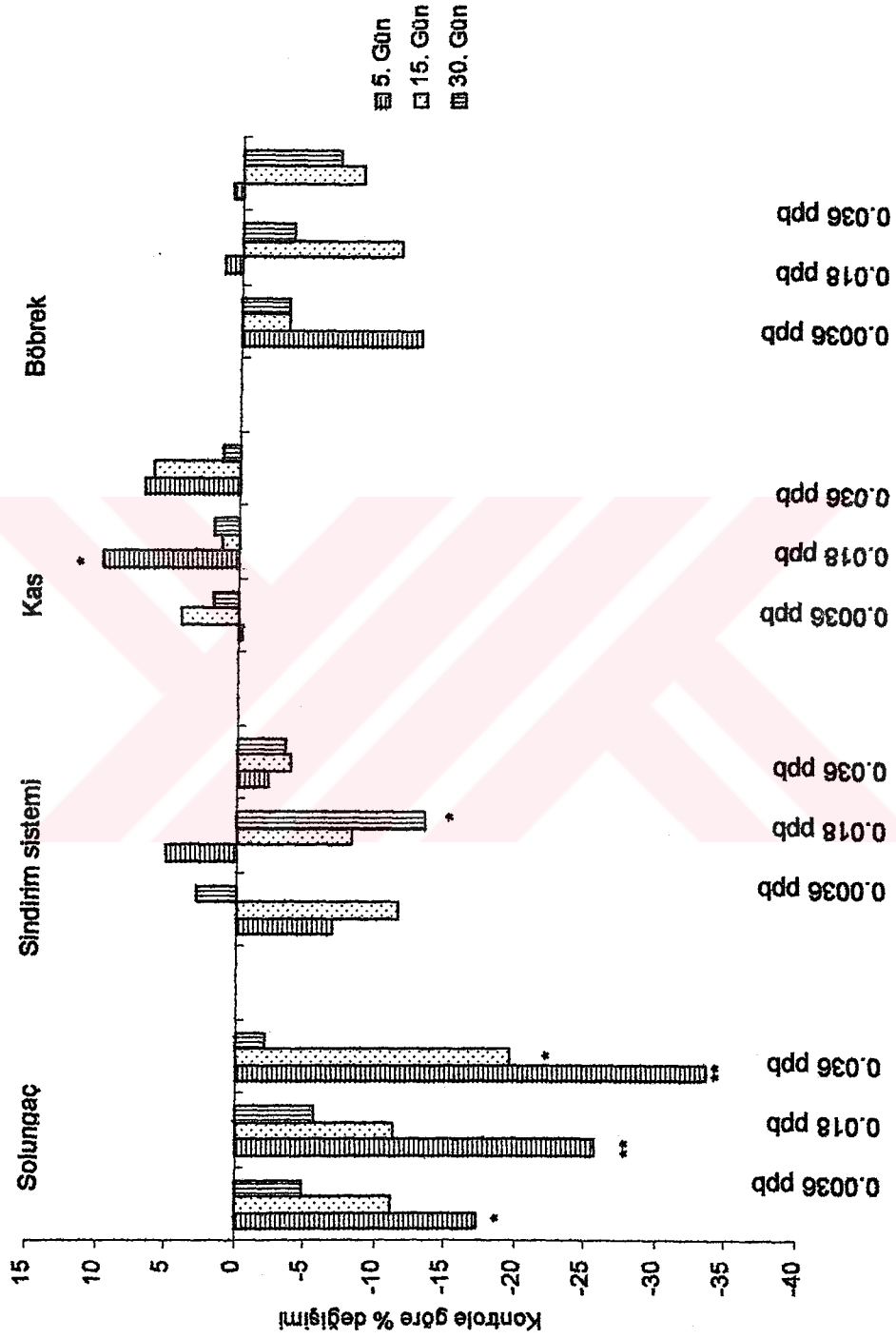
4.1.7. Protein Miktarına Etkileri

Protein miktarı 5 gün süreyle 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb diazinon uygulamalarından sonra kontrole göre sırasıyla %17.28, %25.58 ve %33.59 oranlarında azalma göstermiştir (p<0.05, Çizelge 4.7. ve Şekil 4.7.). On beş gün 0.0036 ppb ve 0.018 ppb diazinon uygulamalarında protein miktarında bir değişiklik olmazken yüksek derişim etkisinde protein miktarında yine %19.59 oranında bir azalma meydana gelmiştir. Otuz gün süreyle diazinon uygulaması protein miktarını değiştirmemiştir (p>0.05).

Çizelge 4.7. Diazinonun *C. carpio*'da solungaç dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi

Derişim (ppb)	Protein Miktarı (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	11.6450±1.2045a	10.4013±0.7356a	11.4238±0.4971a
0.0036	9.6325±0.4979b	9.2400±0.8730ab	10.8713±0.6018a
0.018	8.6663±0.5353bc*	9.2363±0.4090ab	10.7725±0.5483a
0.036	7.7338±0.2654c*	8.3638±0.4679b	11.1788±0.3349a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.7. Diazinonun farklı derişimlerinde solungaç, sindirim sistemi, kas ve böbrek dokularında protein miktarının (mg/mL) kontrole göre % değişimi. * $p < 0.05$ ve ** $p < 0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.2. Sindirim Sistemi

4.2.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri

Otuz gün süreyle diazinon uygulamaları *C. carpio*'da sindirim sisteminde AChE aktivitesinde bir değişime neden olmamıştır ($p>0.05$, Çizelge 4.8. ve Şekil 4.1.).

Çizelge 4.8. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde AChE aktivitesine (U/ mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	AChE Aktivitesi (U/ mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0,0428±0.0050a	0,0144±0.0005a	0,0106±0.0006a
0.0036	0,0401±0.0032a	0,0110±0.0003a	0,0091±0.0008a
0.018	0,0433±0.0076a	0,0139±0.0009a	0,0129±0.0009a
0.036	0,0396±0.0032a	0,0115±0.0007a	0,0103±0.0007a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri

Süperoksit dismutaz aktivitesi 5 gün süreyle 0.0036 ppb diazinon uygulamasından sonra kontrolden %31.64 daha az bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer derişimler enzim aktivitesini etkilememiştir ($p>0.05$). Diazinon etkisinde 15 ve 30 gün kalan balıklarda enzim aktivitesinin değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$, Çizelge 4.9. ve Şekil 4.3.)

Çizelge 4.9. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0,0335±0,0052a	0,0132±0,0006a	0,0148±0,0009a
0.0036	0,0229±0,0010b	0,0142±0,0016a	0,0072±0,0006a
0.018	0,0320±0,0099ab	0,0129±0,0009a	0,0124±0,0016a
0.036	0,0255±0,0019ab	0,0131±0,0009a	0,0105±0,0003a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.2.3. Glutasyon Peroksidaz ve Katalaz Enzim Aktiviteleri ile Malondialdehit Miktarına Etkileri

Diazinon uygulamalarından 5 gün sonra GPx ve CAT enzim aktivitelerinde azalma ile birlikte MDA miktarında artışlar belirlenmiştir ($p<0.05$, Çizelge 4.10., 4.11. ve 4.12.). Glutasyon peroksidaz spesifik aktivitesi 0.036 ppb derişime kontrole

göre %34.92'lik bir azalma ile cevap verirken, CAT spesifik aktivitesi 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb diazinon uygulamalarına sırasıyla kontrole göre %70.73, %42.19, %73.42'lik azalmalar şeklinde cevap vermiştir. Buna karşın, MDA miktarı 0.0036 ppb, ve 0.036 ppb diazinon uygulamalarına sırasıyla kontrole göre %52.79 ve %30.12'lik artışlar göstermiştir (Şekil 4.4., 4.5. ve 4.6.).

Çizelge 4.10. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Doz (ppb)	GPx Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0,2620±0,0356a	0,1639±0,0086a	0,1497±0,0043a
0.0036	0,2783±0,0198a	0,1614±0,0069a	0,1334±0,0090a
0.018	0,2685±0,0456a	0,1710±0,0080a	0,1595±0,0138a
0.036	0,1705±0,0050b*	0,1582±0,0079a	0,1226±0,0130a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.11. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Doz (ppb)	CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	53,5054±8,4622a	11,8297±1,6585a	14,8886±1,8072a
0.0036	15,6622±3,0739b*	13,2188±0,9345a	14,2632±1,9578a
0.018	30,9331±2,9526c*	10,8285±0,8179a	15,2984±1,6976a
0.036	14,2228±2,8915b*	16,9247±1,6025a	10,8780±2,4460a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.12. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Doz (ppb)	MDA Miktarı (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	1,0503±0,1671a	0,1946±0,0229a	0,3014±0,0242a
0.0036	1,6047±0,0751bc*	0,1434±0,0330a	0,2380±0,0469a
0.018	1,1022±0,2702ac	0,2118±0,0222a	0,3137±0,0231a
0.036	1,3666±0,0824c	0,2285±0,0481a	0,2158±0,0454a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2.4. Protein Miktarına Etkileri

Beş ve 15 gün diazinon etkisinde kalan balıklarda protein miktarının değişmediği bulunmuştur (p>0.05, Çizelge 4.13.). Protein miktarı 30 gün süreyle

0.018 ppb diazinon uygulamasından sonra kontrolden %13.45 daha az bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer derişimler aynı süre içinde protein miktarını etkilememiştir ($p>0.05$, Şekil 4.7.).

Çizelge 4.13. Diazinonun *C. carpio*'da sindirim sisteminde protein miktarına (mg/mL) etkisi

Derişim (ppb)	Protein Miktarı (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	4,9250±0,6799a	14,8500±0,4228a	15,7125±0,5321a
0.0036	4,5875±0,0826a	13,1375±0,8035a	16,1500±0,7391a
0.018	5,1750±0,7409a	13,6250±0,7949a	13,6000±1,0446b
0.036	4,8125±0,2703a	14,2750±0,5555a	15,1625±0,7333ab

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.3. Kas Dokusu

4.3.1. Asetilkolinesteraz Aktivitesine Etkileri

Diazinon denenen tüm derişimlerde ve sürelerde *C. carpio*'da kas dokusunda asetilkolinesteraz aktivitesinin %37.27-%55.51 azalmasına neden olmuştur ($p<0.01$, Çizelge 4.14. ve Şekil 4.1.).

Çizelge 4.14. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda AChE aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	AChE Aktivitesi (U/ mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0,0263±0,0014a	0,0271±0,0009a	0,0256±0,0013a
0.0036	0,0164±0,0008b*	0,0125±0,0009bd*	0,0122±0,0003b*
0.018	0,0155±0,0004b*	0,0170±0,0007cd*	0,0128±0,0007b*
0.036	0,0117±0,0006b*	0,0144±0,0005d*	0,0131±0,0007b*

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.3.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Aktivitesine Etkileri

Beş gün süreyle pestisit etkisine bırakılan *C. carpio* örneklerinde yüksek derişim etkisinde enzim aktivitesi kontrole göre %23.16 azalırken ($p<0.01$), düşük derişimler aktiviteyi etkilememiştir ($p>0.05$). On beşinci günde 0.0036 ppb ve 0.036 ppb derişimler aktiviteyi sırasıyla %12 ve %19.65 azaltırken ($p<0.01$), 0.018 ppb diazinon aktiviteyi etkilememiştir ($p>0.05$). Otuzuncu günde sadece 0.018 ppb ve 0.036 ppb derişimler etkisinde sırasıyla %19.60 ve %21.03 azalmalar belirlenmiştir ($p<0.01$, Çizelge 4.15. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.15. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda Na^+K^+ -ATPaz aktivitesine ($\mu\text{mo}/\text{mg protein/saat}$) etkisi

Derişim (ppb)	Na^+K^+ -ATPaz Aktivitesi ($\mu\text{mo}/\text{mg protein/saat}$)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	25.9514±0,6664a	24,3173±0,4501a	24,0910±0,5794a
0.0036	26,6027±1,2931a	21,3948±0,7561b*	23,0370±0,6803a
0.018	26,0559±0,5976a	24,5810±0,8776a	19,3689±0,4358b*
0.036	19,9411±0,7149b*	19,5355±0,5543b*	19,0241±0,4693b*

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

4.3.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri

Beş gün süreyle diazinon uygulamasına bırakılan balıklarda 0.018 ppb ve 0.036 ppb derişimlerin etkisinde sırasıyla %27.62 ve %48.62 artma varken ($p<0.01$), düşük derişim aktiviteyi etkilememiştir. On beş gün ve 30 gün 0.018 ppb diazinon uygulamasında aktivitede %43 artış devam etmiş ($p<0.01$) diğer derişimler etki gösterememiştir ($p>0.05$, Çizelge 4.16. ve Şekil 4.3.).

Çizelge 4.16. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0181±0.0009a	0.0179±0.0008a	0.0176±0.0010a
0.0036	0.0188±0.0008a	0.0171±0.0014a	0.0206±0.0015a
0.018	0.0231±0.0004b	0.0256±0.0018b*	0.0252±0.0015b*
0.036	0.0269±0.0024c*	0.0202±0.0006a	0.0210±0.0013a

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

4.3.4. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri

Beş ve 15 gün sürelerle 0.0036 ppb, 0.018 ppb ve 0.036 ppb diazinon uygulamalarından sonra enzim aktivitesinin değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$). Otuz gün diazinon uygulamasından sonra 0.0036 ppb ve 0.036 ppb derişimlerin etkisinde aktivitenin sırasıyla %20.59 ve %27.94 arttığı belirlenmiştir ($p<0.01$, Çizelge 4.17. ve Şekil 4.4.). Enzim aktivitesi 0.018 ppb diazinon etkisinde değişmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.17. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	GPx Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0286±0.0024a	0.0276±0.0010ab	0.0272±0.0012a
0.0036	0.0281±0.0017a	0.0284±0.0010ab	0.0353±0.0003b*
0.018	0.0280±0.0018a	0.0302±0.0010a	0.0281±0.0014a
0.036	0.0246±0.0017a	0.0249±0.0003b	0.0348±0.0006b*

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3.5. Katalaz Aktivitesine Etkileri

Bu çalışmada asetilkolinesterazdan sonra diazinon toksisitesine düşük derişimde dahi cevap veren tek enzim katalaz olmuştur. Beş günlük pestisit uygulaması enzim aktivitesinde doza bağlı olarak sırasıyla %15.07, %42.39 ve %58.15'lik düşüşe neden olmuştur (p<0.01). On beşinci günde düşük derişim aktiviteyi etkilemezken, 0.018 ppb etkisinde %9.19, 0.036 ppb etkisinde %39.68'lik azalmalar görülmüştür. Otuzuncu günde 0.0036 ppb etkisinde %10.08, 0.036 ppb etkisinde %26.55'lik azalmalar meydana gelmiştir (p<0.01, Çizelge 4.18. ve Şekil 4.5.). Enzim aktivitesi 0.018 ppb diazinon etkisinde değişmemiştir (p>0.05).

Çizelge 4.18. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda CAT aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	2.0544±0.0230a	2.1205±0.0680a	2.0268±0.0601a
0.0036	1.7449±0.0880b*	1.9569±0.0631ab	1.8225±0.0484b
0.018	1.1836±0.0585c*	1.9256±0.0945b	1.9173±0.0260ab
0.036	0.8598±0.0312d*	1.2792±0.0732c*	1.4887±0.0411c*

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.3.6. Malondialdehit Miktarına Etkileri

Katalaz aktivitesindeki azalmanın tam tersine 5 günlük pestisit uygulaması malondialdehit miktarında doza bağlı olarak sırasıyla %30.46, %38.01 ve %114.00'lik artışa neden olmuştur (p<0.01). En fazla artış en yüksek derişimde görülmüştür. Diğer sürelerde sadece yüksek derişim etkisinde malondialdehit miktarının %25 oranında kontrol ve diğer uygulama gruplarından daha fazla olduğu

görülmektedir ($p<0.01$, Çizelge 4.19. ve Şekil 4.6.). Diğer derişimler etkisinde malondialdehit miktarı kontrol düzeyinde kalmıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.19. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	MDA Miktarı (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.6256±0.0286a	0.6628±0.0153a	0.6366±0.0333ab
0.0036	0.8163±0.0337b*	0.6585±0.0394a	0.6010±0.0192a
0.018	0.8635±0.0241b*	0.6689±0.0151a	0.6924±0.0073b
0.036	1.3390±0.0685c*	0.8319±0.0147b*	0.7952±0.0066c*

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.3.7. Protein Miktarına Etkileri

Protein miktarı 5 gün süreyle 0.018 ppb diazinon uygulamasından sonra kontrole göre %9.70 artmıştır ($p<0.05$). Diğer derişimler protein miktarını etkilememiştir ($p>0.05$). On beş ve 30 gün diazinon etkisinde kalan balıklarda protein miktarının değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$, Çizelge 4.20. ve Şekil 4.7.).

Çizelge 4.20. Diazinonun *C. carpio*'da kas dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi

Derişim (ppb)	Protein Miktarı (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	10.2313±0.6666a	10.1838±0.0917a	10.5063±0.2895a
0.0036	10.1937±0.4980a	10.5988±0.3055a	10.6900±0.1571a
0.018	11.2237±0.2080b	10.3050±0.1567a	10.6863±0.2237a
0.036	10.9238±0.2983ab	10.8113±0.1632a	10.6238±0.2324a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.4. Böbrek Dokusu

4.4.1. Asetilkolinesteraz ve Katalaz Aktiviteleri ile Protein Miktarına Etkileri

Otuz gün süreyle diazinon uygulamaları *C. carpio*'da böbrek dokusunda AChE ve CAT aktiviteleri ile protein miktarında bir değişime neden olmamıştır ($p>0.05$, Çizelge 4.21., 4.22. ve 4.23., Şekil 4.1., 4.5. ve 4.7.).

Çizelge 4.21. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda AChE aktivitesine (U/ mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	AChE Aktivitesi (U/ mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0057±0.0003a	0.0062±0.0004a	0.0056±0.0002a
0.0036	0.0066±0.0005a	0.0061±0.0005a	0.0060±0.0006a
0.018	0.0069±0.0004a	0.0057±0.0007a	0.0064±0.0006a
0.036	0.0059±0.0005a	0.0054±0.0004a	0.0059±0.0002a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.22. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda CAT aktivitesine (U/ mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	CAT Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	20.0914±1.2393abc	21.6957±1.6692a	20.9170±1.7533a
0.0036	23.8659±2.1203a	17,5604±1.2019a	22.0582±1.9993a
0.018	18.5031±1.2293bc	21.5275±1.8619a	19.6761±1.0078a
0.036	16.5856±1.5303c	21.1812±2.8883a	20.0917±1.0600a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.23. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda protein miktarına (mg/mL) etkisi

Derişim (ppb)	Protein Miktarı (mg/mL)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	7.8375±0.6717a	9.1325±0.7755a	9.6050±0.5290a
0.0036	6.8263±0.3421a	8.8150±0.5524a	9.2713±0.2803a
0.018	7.9325±0.2389a	8.0963±0.4593a	9.2513±0.2899a
0.036	7.8900±0.2968a	8.3388±0.4915a	8.8375±0.4143a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler p<0.05, *p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.4.2. Sodyum Potasyum Adenozin Trifosfataz Aktivitesine Etkileri

Beş, 15 ve 30 gün sürelerle pestisit etkisine bırakılan *C. carpio* örneklerinde 0.0036 ppb diazinon etkisinde enzim aktivitesi kontrol düzeyinde kalırken, 0.018 ppb diazinon etkisinde sırasıyla %24.49, %73.54 ve %57.65 ve 0.036 ppb diazinon etkisinde sırasıyla %35.16, %33.61 ve %51.46 düzeylerinde azalmalar bulunmuştur (p<0.01, Çizelge 4.24. ve Şekil 4.2.).

Çizelge 4.24. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda Na^+K^+ -ATPaz aktivitesine ($\mu\text{mo}/\text{mg protein/saat}$) etkisi

Derişim (ppb)	Na ⁺ K ⁺ -ATPaz Aktivitesi ($\mu\text{mo}/\text{mg protein/saat}$)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	29.9507±1.6762a	28.5735±1.9494a	25.0020±1.1779a
0.0036	35.8421±4.3199a	29.0612±0.4945a	19.0928±0.5735a
0.018	22.6151±3.4614b	7.5597±1.4464b*	10.5873±0.9500b*
0.036	19.4208±2.0367b*	18.9695±1.6464c*	12.1368±1.8964b*

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.4.3. Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkileri

Beş gün süreyle diazinon uygulamasına bırakılan balıklarda tüm derişimlerin etkisinde kontrole göre sırasıyla %149.19, %96.09 ve %102.28 oranlarında önemli derecede artışlar bulunurken ($p<0.01$), diğer uygulama periyotlarında enzim aktivitesinin değişmediği bulunmuştur ($p>0.05$, Çizelge 4.25. ve Şekil 4.3.).

Çizelge 4.25. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda SOD aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	SOD Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.0307±0.0015a	0.0283±0.0015a	0.0310±0.0038a
0.0036	0.0765±0.0042b*	0.0330±0.0056a	0.0366±0.0061a
0.018	0.0602±0.0089b*	0.0338±0.0072a	0.0307±0.0042a
0.036	0.0621±0.0111b*	0.0328±0.0038a	0.0313±0.0041a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.4.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesine Etkileri

Bu çalışmada 15 gün süreyle diazinon uygulamasından sonra 0.018 ppb derişim etkisinde enzim aktivitesinde görülen %17.70'lik azalmanın ($p<0.05$) dışında bir etkiye rastlanmamıştır (Çizelge 4.26. ve Şekil 4.4.).

Çizelge 4.26. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda GPx aktivitesine (U/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	GPx Aktivitesi (U/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	0.1922±0.0098a	0.1661±0.0092a	0.1741±0.0108ab
0.0036	0.2127±0.0105a	0.1501±0.0040ab	0.1560±0.0034a
0.018	0.1854±0.0116a	0.1367±0.0039b	0.1601±0.0064a
0.036	0.1997±0.0095a	0.1517±0.0092a	0.1924±0.0176b

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

4.4.5. Malondialdehit Miktarına Etkileri

Diazinon 0.0036 ppb derişimde *C. carpio*'da solungaç dokusunda malondialdehit miktarını değiştirmemiştir ($p>0.05$, Çizelge 4.27. ve şekil 4.6.), Uygulamanın 5. gününde 0.018 ppb derişim etkisinde MDA miktarı kontrolden ve düşük derişimden daha az ($p<0.01$), diğer günlerde kontrol düzeyinde bulunmuştur ($p>0.05$). Beşinci günde 0.036 ppb derişim etkisinde ise MDA miktarı kontrole göre %27.28 azalırken ($p<0.05$) 15. günde kontrolden ve diğer derişimlerden daha fazla olacak şekilde dalgalanma göstermiştir ($p<0.05$). Otuzuncu günde 0.036 ppb diazinon uygulaması MDA miktarını değiştirmemiştir ($p>0.05$).

Çizelge 4.27. Diazinonun *C. carpio*'da böbrek dokusunda MDA miktarına (nmol/mg protein) etkisi

Derişim (ppb)	MDA Miktarı (nmol/mg protein)		
	5. Gün	15. Gün	30. Gün
Kontrol	1.6839±0.0932a	1.3967±0.0970a	1.4066±0.0459a
0.0036	1.3364±0.0309ab	1.0839±0.1903a	1.6770±0.1958a
0.018	1.1392±0.1554b*	1.1690±0.1345a	1.7178±0.1139a
0.036	1.2246±0.1229b	1.7974±0.0775b	1.7052±0.1585a

Değerler Aritmetik ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir (n=4). Farklı harfler ile gösterilen veriler $p<0.05$, * $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

5. TARTIŞMA

Pestisitler serbest radikal oluşumu yoluyla oksidatif stresi indükleyebilir ve lipid peroksidasyonuna neden olabilirler (Banerjee ve ark.,1999). Pestisitlerin neden olduğu pro-oksidan koşullar adaptif bir yanıt olarak antioksidan enzim aktivitelerinin artmasına sebep olabilir (Alves ve ark., 2002).

Süperoksit dismutaz, $O_2^{\cdot-}$ 'nin H_2O_2 ve suya dismutasyonunu katalizler ve oluşan H_2O_2 , CAT tarafından su ve oksijene dönüştürülür ya da GPx aktivitesi ile detoksifiye edilir. Bu nedenle bir antioksidan olarak SOD'un etkinliği $O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyon ürünü olan H_2O_2 'yi metabolize eden CAT ve GPx enzimleri ile bir arada çalışmasına bağlıdır. (Lackner, 1998). Diazinon etkisinde *C. carpio*'da solungaç ve böbrek dokularında ilk 5 gün sonunda SOD aktivitesi artmış diğer sürelerde değişim olmamıştır. Sindirim sisteminde 5 gün süre ile diazinon uygulamasından sonra 0.0036 ppb derişimde aktivite azalmış diğer sürelerde ve derişimlerde değişim olmamıştır. Kas dokusunda 5 gün süre ile diazinon etkisinde yüksek derişimlerde enzim aktivitesinde doza bağlı artış bulunmuştur. On beşinci ve 30. gün 0.018 ppb diazinon etkisinde aktivitedeki artış devam etmiş diğer derişimlerde değişim olmamıştır. Yüksek SOD aktivitesi dokuda $O_2^{\cdot-}$ üretiminde artış olduğunun göstergesidir. Dichlorvos etkisinde *I. nebulosus*'ta (Hai ve ark., 1997), azinphosmethyl etkisinde *C. carpio*'da SOD aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Oruç ve Üner, 2002). Süperoksit radikal ya da onun H_2O_2 oluşumu enzimde sistemin güçlü şekilde oksidasyonuna neden olur ve SOD'un aktivitesini azaltır (Radi ve Matkovics, 1988). Azinphosmethyl etkisinde *O. niloticus*'da SOD aktivitesi azalmıştır (Oruç ve Üner, 2000).

C. carpio'da solungaç dokusunda 5 gün süre ile diazinon etkisinde GPx aktivitesinin yüksek derişimlerde, 15 gün sonunda sadece en yüksek derişimde ve 30 gün uygulama sonunda tüm derişimlerde arttığı bulunmuştur. Sindirim sisteminde ilk 5 gün sonunda en yüksek derişimde, böbrek dokusunda 15 gün uygulama sonunda 0.018 ppb derişimde aktivite azalmıştır. Kas dokusunda 5 ve 15 gün süre ile diazinon uygulaması aktiviteyi değiştirmemiş, 30 gün sonunda en düşük ve en yüksek derişimlerde GPx aktivitesi artmıştır. Glutatyon peroksidaz aktivitesi ksenobiyotikler

ile indüklenabilir (Hamed ve ark., 1999). Glutasyon peroksidaz indüksiyonu ile oksidatif stres sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerin detoksifikasyonları sağlanır (Banerjee ve ark., 1999). Böylece peroksid derişimi azaltılarak serbest radikal hasarına karşı koruma sağlanır (Watson ve ark., 1999). *O. niloticus*'da azinphosmethyl etkisinde GPx aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Oruç ve Üner, 2000). Hai ve ark. (1997) dichlorvos etkisinde *C. carpio*'da GPx aktivitesinin arttığını bildirmişleridir. Ahmad ve ark. (2000), $O_2^{\cdot-}$ 'den türevlenen H_2O_2 'nin aşırı üretimi ve onun enzim-indükleyici etkisi nedeniyle GPx aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. *C. carpio*'da diazinon etkisinde solungaç ve kas dokularında SOD ve GPx aktiviteleri ile birlikte MDA miktarında arttığı belirlenmiştir. Süperoksit dismutaz ve GPx aktivitesinde görülen artış, dokuda her iki enzimin lipoperoksit derişiminin korunmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Almeida ve ark., 2002). Glutasyon peroksidaz ve SOD'nin en önemli özelliklerinden birisi oksidatif stres durumunda indüklenebilmeleridir ve bu tip bir indüksiyon kirlerticilerin neden olduğu strese karşı önemli bir adaptasyon olabilir (Cheung ve ark., 2001). Organik hidroperoksitlerin ve H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda GPx GSH'ı kofaktör olarak kullanır. Bu nedenle sellüler GSH miktarının azalması GPx aktivitesinin azalmasına neden olur (Geret ve ark., 2002). Pestisit etkisinde balıkta farklı dokularda GPx aktivitesinin düşük olması, bu organların pestisitlerin etkilerini nötralize etmede yetersiz olduklarını gösterir (Ahmad ve ark., 2000).

C. carpio'da diazinon etkisinde böbrek dokusunda CAT aktivitesi değişmemiş, solungaç dokusunda 5 gün diazinon uygulamasından sonra 0.018 ppb derişimde aktivite artmıştır. Sindirim sisteminde ilk 5 gün sonunda uygulanan tüm derişimlerde aktivitede azalma meydana gelmiştir. Diğer sürelerde ve derişimlerde değişim olmamıştır. Kas dokusunda 5 gün diazinon uygulamasından sonra CAT aktivitesi doza bağlı olarak, 15 ve 30 gün uygulamalardan sonra yüksek derişimlerde azalmıştır. Katalaz indüklenebilen sitosolik bir enzimdir (Romeo ve ark., 2000), H_2O_2 'yi O_2 ve suya parçalayarak dokuları H_2O_2 'nin toksik etkilerine karşı korur (Lackner, 1998). Farklı balık türlerinde pestisit etkisinde CAT aktivitesinde indüksiyon ve inhibisyonun meydana geldiği bildirilmiştir. *I. nebulosus*'ta dichlorvos etkisinde CAT aktivitesi doza bağlı olarak artmıştır (Hai ve ark., 1997). *H. fossilis*'te

monocrotophorus CAT aktivitesinin azalmasına neden olmuştur (Thomas ve Murthy, 1976). Pandey ve ark. (2001) CAT aktivitesinde belirlenen azalmanın $O_2^{\cdot -}$ üretiminden kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Diazinon etkisinde *C. carpio*'da kas dokusunda SOD aktivitesi artarken, CAT aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir. Baily ve ark. (1996), ksenobiyotiklerle üretilen $O_2^{\cdot -}$ 'e karşı artan SOD ile ilgili olarak CAT aktivitesinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Jet ve Navoa (2000), reaktif oksijen türlerin uzun süreli üretimlerinin CAT transkripsiyonunu indükleyerek aktivitesinin artmasına neden olabileceğini belirtmişlerdir. Katalaz aktivitesinde önemli bir değişim olmaması H_2O_2 oluşumuna karşı koruma sağlayan GPx'in yüksek aktivitesi nedeni ile olabilir (Radi ve Matkovics, 1988).

Kimyasal stres durumunda antioksidan sistem indüklenebilir ya da inhibe olabilir (Cossu ve ark., 2000). Ksenobiyotik konsantrasyonunun artışının antioksidan aktiviteyi indüklemesi genel bir kural değildir (Cheung ve ark., 2001). Ksenobiyotik ile ilk etkileşimde azalma şeklinde görülen yanıt, daha sonra antioksidan sistemin indüksiyonu ile devam edebilir. Bu nedenle indüklenebilen bir antioksidan sistemin varlığı canlının adaptasyonunu yansıtır (Doyotte ve ark., 1997).

Farklı balık türlerinde oksidatif strese karşı antioksidan yanıt açısından dokuların farklılık gösterdikleri, bu farklılığın dokuların antioksidan durumlarının farklılıklarından ileri gelebileceği belirtilmiştir (Ahmad ve ark., 2000). Sayeed ve ark. (Baskıda), yaptıkları çalışma sonucunda solungaçların ksenobiyotik indüklü lipid peroksidasyonuna karşı en duyarlı organ olduklarını ve karaciğer ve böbrek dokuları ile karşılaştırıldıklarında antioksidan potansiyellerinin zayıf olduğunu ileri sürmüşlerdir. Üner ve ark. (2001) kontrol balıklarda karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinin böbrek dokusuna göre daha yüksek olduğunu, ancak pestisit etkisinde antioksidan enzimlerin indüksiyonunun böbrek dokusunda daha yüksek düzeyde meydana geldiğini bildirmişlerdir.

C. carpio'da solungaç dokusunda 5 ve 15 gün süreler ile diazinon uygulaması sonunda AChE aktivitesi değişmemiş, 30 gün uygulama sonunda en düşük ve en yüksek derişimlerde aktivite azalmıştır. Sindirim sistemi ve böbrek dokusunda 30 gün süre ile diazinon uygulaması AChE aktivitesini değiştirmemiştir. Kas dokusunda diazinonun denenen tüm derişimlerinde ve sürelerde aktivite azalmıştır.

Asetilkolinesteraz aktivitesinde %20 oranında inhibisyon meydana gelmesi organofosforlu pestisitlerin etkisinde kalmanın göstergesidir. İnhibisyon %50 ya da daha yüksek düzeylerde meydana geldiğinde yaşamı tehdit eden bir durumu gösterir (Day ve Scott, 1990). Ancak yapılan çalışmalar balıkların >%90 AChE inhibisyonunu tolere edebildiğini göstermiştir. Balint ve ark. (1995) methidathion etkisinde %90-92 ve Pan ve Dutta (1998) diazinon ile %91.4 düzeyinde inhibisyon belirlemekle beraber mortalite kaydetmemişlerdir. Keizer ve ark. (1995), *C. carpio*'nun çok duyarlı bir AChE'ye sahip olmasına rağmen, düşük biyoaktivasyon oranı ve detoksifikasyon enzimlerinin yüksek aktivitesi nedeni ile diazinon toksisitesine karşı çok dirençli olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Organofosforlu pestisitler ile yapılan çalışmalarda AChE inhibisyonunun doz (Keizer ve ark., 1991; Pan ve Dutta, 1998) ve süreye (Ansari ve ark., 1987) bağlı olarak inhibe olduğu ve inhibisyon oranlarının tür ve dokuya özgü farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (Keizer ve ark., 1995; Szegletes ve ark., 1995). *A. anguilla*'da fenitrothion uygulamasının kesilmesinden sonra da AChE aktivitesinde doza bağlı olarak azalma kaydedilmiş ve enzim aktivitesinin normale dönmesi için gereken sürenin uzun olduğu bildirilmiştir. Bu durum enzim rejenerasyonunun başlıca *de novo* sentez ile olması şeklinde açıklanmıştır (Sancho ve ark., 1998). İnhibisyonun derecesi arttıkça, ihtiyaç duyulan protein sentezi de artar (Fulton ve Key, 2001). Balint ve ark. (1995), AChE'nin yenilenmesi için gereken sürenin uzun olmasının sadece AChE-organofosfat bağının stabilitesinden değil, aynı zamanda enzimin *de novo* sentezinin inhibe olmasından kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

C. carpio'da solungaç dokusunda 5 gün süre ile diazinon uygulamasından sonra 0.0036 ppb derişimde Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi artmış, 0.018 ppb derişimde azalmıştır. Uygulanan diğer sürelerde aktivite değişmemiştir. Kas ve böbrek dokularında enzim aktivitesinin 30 günlük periyotta özellikle yüksek derişimlerde azaldığı bulunmuştur. Ksenobiyotik indüklü Na^+K^+ -ATPaz inhibisyonu canlılarda zararlı sonuçlara neden olabilir. Sodyum potasyum adenozin trifosfat, osmoregülasyonda ve Na^+ , K^+ transmembran gradientlerinin korunmasında rol oynadığından, inhibisyonu kanın iyonik konsantrasyonunu değiştirebilir ve solungaç

dokusuna hasar verebilir (Yadwad ve ark., 1990).Yapılan çalışmalar pestisit etkisinde balıklarda ATPaz aktivitesinin duyarlı bir enzimatik indikatör olduğunu göstermektedir. Farklı pestisitler ile yapılan çalışmalarda farklı balık türlerinde ATPaz aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmiştir. *T. zillii* ve *O. niloticus*'da azinphosmethyl etkisinde Na^+K^+ -ATPaz aktivitesi azalmıştır (Oruç ve ark., 2002). Reddy ve ark. (1991), kas dokusunda ATPaz aktivitesinde meydana gelen inhibisyonun kas fibrillerinde iyon akımını bozarak kas aktivitesinin ve dengenin azalmasına neden olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Das ve Mukherjee (2000; 2003), yaptıkları çalışmalarda farklı dokularda ATPaz aktivitesinde meydana gelen inhibisyonun dokuda hipoksik şartların bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir. Sancho ve ark. (1997) solungaç dokusunda Na^+ , K^+ ve Mg^{+2} ATPaz aktivitelerinde belirledikleri azalmaların toksik maddenin enzimi doğrudan etkilemesi ya da solungaçlarda oluşan primer letal lezyonlardan kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Pestisit etkisi ile ATPaz aktivitesinin artması ATP'nin hidroliz oranının artması nedeni ile metabolizmanın ve enerji tüketiminin arttığını gösterir.

Lipid peroksidasyonu oksidatif stres ile indüklenen başlıca olaylardan biridir. Reaktif oksijen türler oksidatif işlemleri arttırırlar ve hücre membranlarında lipid peroksidatif hasara neden olurlar. Demir katalizli Fenton reaksiyonu yolu ile $\text{HO}^\bullet$ 'nun lipid peroksidasyonunun öncüsü olduğu ileri sürülür. *C. carpio*'da solungaç dokusunda 5 gün diazinon uygulamasından sonra yüksek derişimlerde, 15 gün sonunda en düşük ve en yüksek derişimlerde MDA miktarı artmıştır. Otuz gün diazinon uygulamasından sonra en düşük derişimde MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. Sindirim sisteminde 5 gün süre ile diazinon etkisinde en düşük ve en yüksek derişimlerde MDA miktarı artmıştır. Kas dokusunda ilk 5 gün uygulama sonunda MDA miktarı doza bağlı olarak artmıştır. On beşinci ve 30. günlerde en yüksek derişimde MDA miktarının arttığı bulunmuştur. Böbrek dokusunda 5 gün sonunda MDA miktarında yüksek derişimlerde azalma belirlenmiştir. Onbeş gün diazinon uygulamasından sonra ise en yüksek derişimde MDA miktarı artmıştır. *H. fossilis*'te dichlorvos etkisinde MDA miktarı doza bağlı olarak artmıştır (Vadhva ve Hasan, 1986). Dokularda lipid peroksidasyonunun meydana gelmemesi ya da düşük düzeylerde olması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin göstergesidir.

Yang ve ark. (1996), AChE inhibitörünün indüklediği kolinerjik hiperaktivitenin serbest radikallerin akümülyasyonunu başlatarak lipid peroksidasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle diazinon aracılıklı lipid peroksidasyonu insektisit antikolinesteraz aktivitesiyle ilişkili olabilir.

Lipid peroksidasyonundaki artış biyolojik membranların anatomik bütünlüklerini ve akışkanlıklarını bozabilir. Sodyum potasyum adenosin trifosfataz ve AChE membran-bağlı enzimlerdir ve aktiviteleri membran fosfolipid yapısına bağlıdır. Membranın lipid bileşimindeki herhangi bir değişim bu enzimlerin aktivitelerini doğrudan etkiler (Sahoo ve ark., 1999). Membran akışkanlığında meydana gelen değişikliklerin dolaylı ya da reaktif oksijen türlerin ve MDA düzeyinin doğrudan etkisinde Na^+K^+ -ATPaz aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmiştir (Rauchova ve ark., 1999). Diğer yandan ATPaz ve AChE aktivitesinde meydana gelen inhibisyon serbest radikal oluşumunu başlatarak lipid peroksidasyonuna neden olabilir. Diazinon etkisinde *C. carpio*'da kas dokusunda Na^+K^+ -ATPaz ve AChE aktivitelerindeki azalma ile birlikte MDA miktarının arttığı belirlenmiştir. Organofosforlu pestisitlerin asıl etki mekanizmasının AChE inhibisyonu olmasına rağmen, yüksek lipid peroksidasyonu ve ATPaz aktivitesindeki değişimin organofosforlu pestisitlerin toksisitesine aracılık edebileceği bildirilmiştir (Hazarika ve Sarkar, 2001).

Diazinon etkisinde *C. carpio*'da protein miktarı böbrek dokusunda değişmemiş, kas dokusunda 5 gün uygulamadan sonra 0.018 ppb derişimde artmış ve sindirim sisteminde 30 gün sonunda 0.018 ppb derişimde azalmıştır. Solungaç dokusunda protein miktarı 5 gün süre ile diazinon uygulamasından sonra doza bağlı olarak azalmıştır. On beş gün uygulamadan sonra protein miktarı en yüksek derişimde azalmış diğer sürede değişim olmamıştır. Reaktif oksijen türler serbest ya da protein bağlı amino asitleri ve yapısal proteinleri doğrudan okside ederek enzimlerin ve reseptörlerin inaktivasyonuna neden olurlar (Facchinetti ve ark., 1998). Diazinon etkisinde *C. carpio*'da solungaç dokusunda protein miktarı azalırken MDA miktarının arttığı bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA, Schiff baz oluşumu ile lipid ve proteinlerin amino grupları ile çapraz bağlanma yeteneğindedir ve ayrıca MDA varlığı spesifik membran proteinlerinin

polimerizasyonu ile ilişkilidir (Radi ve Matkovics, 1988). Diazinon uygulaması protein metabolizmasını arttırabilir, protein sentezini inhibe edebilir (Pan ve Dutta, 2000), spesifik amino asitler için metabolik işlemleri değiştirebilir ve protein eksikliğine neden olabilir (Handy ve ark., 2000). *C. carpio*'da solungaç dokusunda protein miktarında görülen azalma genel stres yanıtı dolaylı olarak olabilir. Pestisit indüklediği bu azalma, enerji ihtiyacı arttığında balığın kendini değişen metabolik sisteme adapte etmek üzere meydana getirdiği fizyolojik bir stratejidir. Bu olay proteoliz gibi degradatif işlemlerin stimülasyonuna ve artan enerji metabolizması için parçalanma ürünlerinin kullanımına neden olur (Begum ve Vijayaraghavan, 1996). Stres durumunda balıklarda yüksek miktarda katekolamin sentezlenir ve böylece glikojen rezervleri tüketilir. Karbohidrat temelli enerji kaynağı olmadığında memelilerin aksine balıklar doğrudan proteinleri kullanabilirler (Shakoori ve ark., 1996). Dimethoate uygulaması *C. batrachus*'ta protein düzeyini önemli düzeyde azaltmıştır (Begum ve Vijayaraghavan, 1996). Phosphamidon etkisinde *P. conchoni*'ta kanda ve karaciğerde zarar görmüş hücre organellerinin tamiri ve doku rejenerasyonunu sağlamak üzere protein sentezi artmıştır. Ayrıca doku nekrozu ya da insektisit detoksifikasyonu sırasında azalan enzim miktarının, enzim proteinlerinin sentezinin artmasını gerektirebileceği bildirilmiştir (Gill ve ark., 1990).

Antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler, AChE ve Na^+K^+ -ATPaz aktivitelerinin, pestisit doğrudan etkisiyle ya da lipid peroksidasyonu nedeniyle, inhibe olması diazinon dokularda oksidatif strese neden olduğunun göstergesidir. Yapılan çalışma subletal dozlarda diazinon etkisinde bırakılan *C. carpio*'da oksidatif strese karşı dokuya özgü adaptif yanıtlar geliştiğini göstermektedir. Ayrıca çalışma bulguları, organofosforlu bir pestisit olarak diazinonun asıl etki mekanizması olan AChE aktivitesinin inhibisyonunun yanı sıra güçlü bir Na^+K^+ -ATPaz inhibitörü olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Solungaç dokusunda SOD ve GPx'in koruyucu etkilerine karşın lipid peroksidasyonunun engellenemediği görülmüştür. Başlangıçta SOD aktivitesinin devamında GPx aktivitesinin artmış olması, ilk günlerden itibaren SOD fonksiyonu ile oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonunu sağlamak üzere GPx aktivitesinin arttığını göstermektedir. Diazinon solungaç dokusunda nörotoksisiteye neden olmuştur. Pestisit denenen derişimleri bu dokuda iyon iletimini genel olarak etkilememiştir.

Diazinonun denenen derişimleri sindirim sisteminde 30 güne kadar olan periyotta toksisite göstermemiştir.

Kas dokusunda nörotoksisite ve iyon iletiminde değişimler bulunmuştur. Dikkat çekici bir şekilde nörotoksisitenin daha erken meydana geldiği görülmektedir. İyon iletimi ilk olarak yüksek derişimde etkilenmiş, düşük diazinon derişiminde ancak uzun sürede etki etmiştir. En yüksek derişimlerde oksidatif stres indüklenerek lipid peroksidasyonu oluşmuştur. Düşük derişimlerde antioksidan enzimlerin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkileri ilerleyen sürelerde görülmektedir.

Böbrekte nörotoksisite bulunamamış iyon iletiminin değiştiği belirlenmiştir. İlk 5 gün sonunda SOD artışıyla belirlenen oksidatif stresin kalıcı olmadığı, diazinonun denenen derişimlerinin böbrekte peroksidatif zarara neden olacak kadar yüksek olmadığı saptanmıştır.

Protein miktarı sadece solungaç dokusunda derişime bağlı olarak azalmıştır.

Bu çalışmada, pestisit düşük derişimde uzun sürelerde etki edebildiği görülmektedir. Diazinon toksisitesi artan derişime bağlı olarak artmaktadır.

Düşük derişimde kısa sürede cevap vermesi nedeni ile SOD'un diazinonun oksidatif strese bağlı toksisitesini belirlemede biyoindikatör olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington, DC, 1134s.
- AHMAD S., 1995. Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins. (S. Ahmad Ed.) Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology. Chapman & Hall, America, s.238-265.
- AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., and RAISUDDIN, S., 2000. Induction of Hepatic Antioxidants in Freshwater Catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a Biomarker of Paper Mill Effluent Exposure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1519: 37-48.
- ALMEIDA, J.A., DINIZ, Y.S., MARQUES, S.F.G., FAINE, L.A., RIBAS, B.O., BURNEIKO, R.C., NOVELLI, E.L.B., 2002. The Use of Oxidative Stress Responses as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Exposed to *In Vivo* Cadmium Contamination. *Environment International*, 27: 673-679.
- ALMEIDA, M.G., FANINI, F., DAVINO, S.C., AZNAR, A.E., KOCH, O.R., and BARROS, S.B.M., 1997, Pro- and Anti-Oxidant Parameters in Rat Liver After Short-Term Exposure to Hexachlorobenzene. *Human & Experimental Toxicology*, 16: 257-261.
- ALVES, S.R.C., SEVERINO, P.C., IBBOTSON, D.P., da SILVA, A.Z., LOPES, F.R.A.S., SAENS, L.A., and BAINY, A.C.D., 2002. Effects of Furadan in the Brown Mussel *Perna perna* and in the Mangrove Oyster *Crassostrea rhizophorae*. *Marine Environmental Research*, 54: 241-245.
- AMES, B.N., and DUBIN, P.T., 1956. Determination of Inorganic Phosphate in Biological Systems. *Analytical Chemistry*, 28: 1956-1964.
- ANSARI, B.A., ASLAM, M., and KUMAR, K., 1987. Diazinon Toxicity: Activities of Acetylcholinesterase and Phosphatases in the Nervous Tissue of Zebra Fish, *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). *Acta Hydrochimica. Hydrobiologica.*, 15(3): 301-306.

- BAINY, C.D.A., SAITO, E., CARVALHO, S.M.P., JUNQUEIRA, B.C.V., 1996. Oxidative Stress in Gill, Erythrocytes, Liver and Kidney of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) From a Polluted Site. *Aquatic Toxicology*, 34:151-162.
- BALINT, T., SZEGLETES, T., SZEGLETES, ZS., HALASY, K., NEMCSOK, J., 1995. Biochemical and Subcellular Changes in Carp Exposed to the Organophosphorus Methidathion and the Pyrethroid Deltamethrin. *Aquatic Toxicology*, 33: 279-295.
- BANERJEE, B.D., SETH, V., BHATTACHARYA, A., PASHA, S.T., and CHAKRABORTY, A.K., 1999. Biochemical Effects of Some Pesticides on Lipid Peroxidation and Free-Radical Scavengers. *Toxicology Letters*, 107: 33-47.
- BEGUM, G., VIJAYARAGHAVAN, S., 1996. Alteration in Protein Metabolism of Muscle Tissue in the Fish *Clarias batrachus* (Linn) by Commercial Grade Dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 223-228.
- BEGUM, G., VIJAYARAGHAVAN, S., 1999. Effect of Acute Exposure of the Organophosphate Insecticide Rogor on Some Biochemical Aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Environmental Research*, 80(1): 80-83.
- BEUTLER, 1984. Red Cell Metabolism. Second Edition. Grune & Starton, New York, 160s.
- CAJARAVILLE, P.M., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., and VIARENGO, A., 2000. The Use of Biomarkers to Assess the Impact of Pollution in Coastal Environments of the Iberian Peninsula: A Practical Approach. *The Science of the Total Environment*, 247: 295-311.
- CHEUNG, C.C.C., ZHENG, G.J., LI, A.M.Y., RICHARDSON, B.J., and LAM, P.K.S., 2001. Relationships Between Tissue Concentrations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Antioxidative Responses of Marine Mussels, *Perna viridis*. *Aquatic Toxicology*. 52: 189-203

- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J., and van BLADEREN, P.J., 2001. The Interplay of Glutathione-Related Processes in Antioxidant Defence. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10: 141-152.
- COSSU, A., DOYOTTE, A., BABUT, M., EXINGER, A., and VASSEUR, P., 2000. Antioxidant Biomarkers in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, in Response to Different Contamination Profiles of Aquatic Sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45:106-121.
- DAS, B.K., and MUKHERJEE, S.C., 2000. Chronic Toxic Effects of Quinalphos on Some Biochemical Parameters in *Labeo rohita* (Ham.). *Toxicology Letters*, 114: 11-18.
- DAS, B.K., and MUKHERJEE, S.C., 2003. Toxicity of Cypermethrin in *Labeo rohita* Fingerlings: Biochemical, Enzymatic and Haematological Consequences. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134: 109-121.
- DAY, K.E., and SCOTT, I.M., 1990. Use of Acetylcholinesterase Activity to Detect Sublethal Toxicity in Stream Invertebrates Exposed to Low Concentrations of Organophosphate Insecticides. *Aquatic Toxicology*, 18: 101-104.
- DE ZWART, L.L., MEERMAN, J.H.N., COMMANDEUR, J.N.M., VERMEULEN, N.P.E., 1999. Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(1/2): 202-226.
- DEL MAESTRO, R.F., 1980. An Approach to Free Radicals in Medicine and Biology. *Acta Physiol Scand*, 492:153-168.
- DEMBELE, K., HAUBRUGE, E., and GASPAR, C., 2000. Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45: 49-54.
- DFID NRSP PROJECT R7668 (REPORT 6), 2002. Impact and Amelioration of Sediment and Agro-Chemical Pollution in Caribbean Coastal Waters, Environmental Survey of Agro-Chemicals in the Land Water Interface of St Lucia, 91s.

- DI GIULIO, R.T., WASHBURN, P.C., WENNING, R.J., WINSTON, G.W., and JEWELL, C.S., 1989. Biochemical Responses in Aquatic Animals: A Review of Determinants of Oxidative Stress. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8: 1103-1123.
- DOBROTA, D., MATEJOVICOVA (VACHOVA), M., KURELLA, E.G., and BOLDYREV, A.A., 1999. Na/K-ATPase Under Oxidative Stress: Molecular Mechanisms of Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(1): 141-149.
- DOYOTTE, A., COSSU, C., JACQUIN, M.C., BABUT, M., and VASSEUR, P., 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in the Gills and the Digestive Gland of the Freshwater Bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39: 93-110.
- DUTTA, H.M., QADRAI, N., OJHA, J., SINGH, N.K., ADHIKARI, S., DATTA MUNSHI, J.S., and ROY, P.K., 1997a. Effects of Diazinon on Macrophages of Blue Gill Sunfish, *Lepomis macrochirus*: A Cytochemical Evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58: 135-141.
- EL-ELAIMY, I.A., EL-SAADANY, M.M., GABR, S.A., and SAKR, S.A., 1990. Pesticide-Poisoning to Fresh Water Teleost VIII. Ultrastructural Alterations of the Intestine of *Tilapia nilotica* Under Stress of Exposure to Diazinon and Neopybuthrin. *Journal of the Egyptian German Society of Zoology*, 1: 223-236.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M., 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7: 88-95.
- ESCARTIN, E., PORTE, C., 1996. Acetylcholinesterase Inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 34:160-164.
- FACHINETTI, F., DAWSON, V.L., and DAWSON, T.M., 1998. Free Radicals as Mediators of Neuronal Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 18(6): 667-682.

- FATIMA, M., AHMAD, I., SAYEED, I., ATHAR, M., and RAISUDDIN, S., 2000. Pollutant-Induced Over-Activation of Phagocytes is Concomitantly Associated with Peroxidative Damage in Fish Tissues. *Aquatic Toxicology*, 49: 243-250.
- FULLE, S., PROTASI, F., DI TANO, G., PIETRANGELO, T., BELTRAMIN, A., BONCOMPAGNI, S., VECCHIET, L., FANO, G., The Contribution of Reactive Oxygen Species to Sarcopenia and Muscle Ageing. *Experimental Gerontology*, (Baskıda).
- FULTON, H.M., KEY, B.P., 2001. Acetylcholinesterase Inhibition in Estuarine Fish and Invertebrates as an Indicator of Organophosphorus Insecticide Exposure and Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1): 37-45.
- GADAGBUI, B.K.M., and JAMES, M.O., 2000. Activities of Affinity-Isolated Glutathione S-Transferase (GST) From Channel Catfish Whole Intestine. *Aquatic Toxicology*, 49(1-2): 27-37.
- GANONG, W.F., 1999. *Tıbbi Fizyoloji*, Ondokuzuncu Baskı, Barış Kitabevi, Ankara, 939s.
- GERET, F., JOUAN, A., TURPIN, V., BEBIANNO, M.J., and COSSON, R.P., 2002. Influence of Metal Exposure on Metallothionein Synthesis and Lipid Peroxidation in Two Bivalve Mollusks: The Oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resource*, 15: 61-66.
- GILL, T.S., PANDE, J., and TEWARI, H., 1990. Sublethal Effects of an Organophosphorus Insecticide on Certain Metabolite Levels in a Freshwater Fish, *Puntius conchoni* Hamilton. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 36: 290-299.
- GIROTTI, A.W., 1985. Mechanism of Lipid Peroxidation. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 1: 87-95.
- GRIFFITHS, H.R., MOLLER, L., BARTOSZ, G., BAST, A., BENTONI-FREDDARI, C., COLLINS, A., COOKE, M., COOLEN, S., HAENEN, G., HOBERG, A.M., LOFT, S., LUNEC, J., OLINSKI, R., PARRY, J., POMPELLA, A., POULSEN, H., VERHAGEN, H., and ASTLEY, A.B., 2002. Biomarkers. *Molecular Aspects of Medicine*, 23: 101-208.

- HAI, D.Q., VARGA, S.I., MATKOVICS, B., 1997. Organophosphate Effects of Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C, 1: 83-88.
- HALLIWELL, B., and GUTTERIDGE, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York, 936s.
- HAMED, R.R., ELAWA, Sh.E., FARID, N.M., ATAYA, F.Sh., 1999. Evaluation of Detoxification Enzyme Levels in Egyptian Catfish, *Clarias lazera*, Exposed to Dimethoate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 789-796.
- HANDY, R.D., Abd-EL-SAMEI, H.A., BAYOMY, M.F.F., MAHRAN, A.M., ABDEEN, A.M., and EL-ELAIMY, E.A., 2000. Chronic Diazinon Exposure: Pathologies of Spleen, Thymus, Blood Cells, and Lymph Nodes are Modulated by Dietary Protein or Lipid in the Mouse. *Toxicology*, 172: 13-34.
- HATHWAY, D.E., 2000. Toxic Action /Toxicity. *Biological Reviews*, 75: 95-127.
- HAYWARD, N, and TRERISE, M., 2001. Sampling of Winery and Distillery Wastewater. *Environmental Management and Pollution Prevention Bulletin*, 2(9). <http://www.chemung.sun.ac.za/Content/cpe.htm>
- HAZARIKA, A., and SARKAR, S.N., 2001. Effect of Isoproturon Pretreatment on the Biochemical Toxicodynamics of Anilofos in Male Rats. *Toxicology*, 165: 87-95.
- HEATH, A.G., 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*, Second Edition. Lewis Publisher, CRC Press, U.S.A., 356s.
- HORTON, A.A., and FAIRHURST 1987. Lipid Peroxidation and Mechanism of Toxicity. *CRC, Critical Reviews in Toxicology*, 18(1): 27-79.
- <http://www.biochem.uc.ac.uk/bsm/pdbsum/1ids/tracel.html>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1fld/tracel.html>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1gg9/tracel.html>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1gp1/tracel.html>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1kkc/tracel.html>
- <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbsum/1qid/tracel.html>

- INOUE, L.S., McFARLAND, V.A., LUTZ, C.H., JARVIS, A.S., McCANT, D.D., and CLARKE, J.U., 1999. Biomarkers of Oxidative Stress and Genotoxicity in Livers of Field-Collected Brown Bullhead, Dredging Research Technical Notes Collection (EEDP-04-31), U.S. Army Engineer Research and Development Center. www.wes.army.mil/el/dots/eedptn.html
- JAMES, M.O., HEARD, C.S., and HAWKINS, W.E., 1988. Effects of 3-Methylcholanthrene on Monooxygenase, Epoxidehydrolase, and Glutathione S-Transferase Activities in Small Estuarine and Freshwater Fish. *Aquatic Toxicology*, 12: 1-15.
- JETT, D.A., and NAVOA, R.V., 2000. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Chlorpyrifos in Glutathione Peroxidase and Catalase in Developing Rat Brain. *Neuro Toxicology*, 21(1-2): 141-146.
- KAYA, S., ŞANLI, Y., PİRİNÇCİ İ., YAVUZ H., BAYDAN E., DEMET, Ö., BİLGİLİ, A., 1995. *Veteriner Klinik Toksikoloji*, Medisan Yayınevi, Ankara, 300s.
- KAYAALP, O., 1998. *Tıbbi Farmakoloji*, 2. Cilt, 9. Baskı, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 2033s.
- KEHRER, J.P., 1993. Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Critical Reviews in Toxicology*, 23(1): 21-48.
- KEIZER, J., D'AGOSTINO, G., NAGEL, R., VOLPE, T., GNEMI, P., and VITTOZZI, L., 1995. Enzymological Differences of AChE and Diazinon Hepatic Metabolism: Correlation of *In Vitro* Data with the Selective Toxicity of Diazinon to Fish Species. *The Science of the Total Environment*, 171: 213-220.
- KEIZER, J., D'AGOSTINO, G., VITTOZZI, L., 1991. The Importance of Biotransformation in the Toxicity of Xenobiotics to Fish. Toxicity and Bioaccumulation of Diazinon in Guppy (*Poecilia reticulata*) and Zebra Fish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 21, 239-254.
- KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T.C., ABRAMO, K.H., and LEVIN, E.D., 1998. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and

- Emerging Piscine Model Systems. *Environmental Health Perspectives*, 106(7): 375-384.
- KOURIE, J.I., 1998. Interaction of Reactive Oxygen Species with Ion Transport Mechanisms. *American Physiological Society*, 275: 1-24.
- KÖKSOY, A.A., 2002. Na⁺, K⁺-ATPase: A Review. *Journal of Ankara Medical School*, 24(2): 73-82.
- KUHN, H., and BORCHERT, A., 2002. Regulation of Enzymatic Lipid Peroxidation: The Interplay of Peroxidizing and Peroxide Reducing Enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(2): 154-172.
- LACKNER, R., 1998. Oxidative Stress in Fish by Environmental Pollutants. *Fish Ecotoxicology*, 203-224.
- LEVI, P.E., HODGSON, E., 2001. Reactive Metabolites and Toxicity, (E. Hodgson E. and R.C. Smart Eds.). *Introduction to Biochemical Toxicology*, 3rd Edition Wiley-Interscience, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, USA., s.99-129.
- LEVINGS, G.W., HEALY, D.F., RICHEY, S.F., AND CARTER, L.F., 1998. Major Issues and Findings-Organics in Ground Water, Surface Water, Bed Sediment, and Fish Tissue. U.S. Geological Survey Circular 1162. <http://water.usgs.gov/pubs/circ1162>
- LIVINGSTONE, D.R. 1998. The Fate of Organic Xenobiotics in Aquatic Ecosystems: Quantitative and Qualitative Differences in Biotransformation by Invertebrates and Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 120: 43-49.
- LIVINGSTONE, D.R., 1991. Organic Xenobiotic Metabolism in Marine Invertebrates (R. Gilles Ed.). *Advances in Comparative and Environmental Physiology*, Germany, 7: s.46-162.
- LIVINGSTONE, D.R., 2001. Contaminant-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8): 656-666.
- LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.

- MATHER-MIHAICH, E., and DI GIULIO, R., 1986. Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde, Glutathione and Methemoglobin Concentrations in Channel Catfish Exposed to DEF and *N*-Butyl Mercaptan. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 85C(2): 427-432.
- McCORD, J.M., FRIDOVICH, I., 1969. Superoxide Dismutase: An Enzymatic Function for Erythrocyte (Hemocytin). *Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049.
- MOBASHERI, A., AVILA, J., CO'ZAR-CASTELLANO, I., BROWNLEADER, M.D., TREVAN, M., FRANCIS, M.J.O., LAMB, J.F., and MARTY'N-VASALLO, P., 2000. Na⁺, K⁺-ATPase Isozyme Diversity: Comparative Biochemistry and Physiological Implications of Novel Functional Interactions. *Bioscience Reports*, 20(2): 51-91.
- MORETTO, A., JOHNSON, M.K., 1987. Toxicology of Organophosphates and Carbamates, Nato ASI Series, H 13. (L.G. Costa, Ed.), Toxicology of Pesticides: Experimental, Clinical and Regulatory Aspect, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 33-48.
- NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY, 2002. The NRA Review of Diazinon, Canberra, Australia, 103s.
- OHKAWA H., OHISHI N., TAGI K., 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Chemistry*, 95: 351-358.
- ORUÇ, E.Ö., and ÜNER, N., 2002. Marker Enzyme Assessment in the Liver of *Cyprinus carpio* (L.) Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 16(4): 182-188.
- ORUÇ, E.Ö., SEVGİLER, Y., and ÜNER, N., Tissue-Specific Oxidative Stress Responses in Fish Exposed to 2,4-D and Azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, (Baskıda).
- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N., 2000. Combined Effects of 2,4-Diamin and Azinphosmethyl on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127C, 291-296.

- ORUÇ, E.Ö., ÜNER, N., and TAMER L., 2002. Comparision of Na⁺K⁺-ATPase Activities and Malondialdehyde Contents in Liver Tissue for Three Fish Species Exposed to Azinphosmethyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69, 271-277.
- PAN, G., and DUTTA, H.M., 2000. Diazinon Induced Changes in the Serum Proteins of Large Mouth Bass, *Micropterus salmoides*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 287-293.
- PAN, G., DUTTA, H. M., 1998. The Inhibition of Brain Acetylcholinesterase Activity of Juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by Sublethal Concentrations of Diazinon, *Environmental Research*, 79: 133-137.
- PANDEY, S., AHMAD, I., PARVEZ, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., RAISUDDIN, S., 2001. Effect of Endosulfan on Antioxidant of Freshwater Fish *Channa punctatus*, Bloch:1. Protections Against Lipid Peroxidation in Liver by Copper Preexposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 41: 345-352.
- PANDEY, S., PARVEZ, S., SAYEED, I., HAQUE, R., BIN-HAFEEZ, B., and, RAISUDDIN, S., 2003. Biomarkers of Oxidative Stress: A Comparative Study of River Yamuna Fish *Wallago attu* (Bl. and Schn.). *The Science of the Total Environment*, 309: 105-115
- PAYNE, J.F., BAULD, C., DEY, A.C., KICENIUK, J.W., and WILLIAMS, U., 1984. Selectivity of Mixed-Function Oxygenase Enzyme Induction in Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) Collected at the Site of the Baie Verte Newfoundland Oil Spill. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C79: 15-19.
- RADI, A. A., and MATKOVICS, B., 1988. Effects of Metal Ions on the Antioxidant Enzyme Activities, Protein Contents and Lipid Peroxidation of Carp Tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90C(1): 69-72.
- RAO, J.V., RANI, C.H.S., KAVITHA, P., RAO, R.N. and MADHAVENDRA, S.S. 2003. Toxicity of Chlorpyrifos to the *Oreochromis mossambicus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70: 985-992.

- RAO, K.S.P., and RAO, K.V.R., 1984. Tissue Specific Alteration of Aminotransferases and Total ATPases in the Fish (*Tilapia mossambica*) Under Methyl Parathion Impact. *Toxicology Letters*, 20: 53-57.
- RAUCHOVA, H., DRAHOTA, Z., and KOUDELOVA, J., 1999. The Role of Membrane Fluidity Changes and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances Production in the Inhibition of Cerebral Cortex Na^+/K^+ -ATPase Activity. *Physiological Research*, 48: 73-78.
- REDDY, M.P., PHILIP, G.H., and BASHAMOHIDEEN, M.D., 1991. Inhibition of Mg^{2+} and Na^+K^+ -ATPases in Selected Tissues of Fish, *Cyprinus carpio* Under Fenvalerate Toxicity. *Biochemistry International*, 715-721.
- REES, T.J., 1993. Biological Markers of Water Pollution with Specific Reference to Glutathione Conjugation. Glutathione S-Transferase as a Biological Marker of Aquatic Contamination. Research Thesis in Applied Toxicology, <http://www.thecounter.com>
- RIVIERE, J.L., DEVAUX, A., GONIN, O., MONOD, D., 1990. Effects of β -Naphthoflavone and MCPA on Liver and Kidney Drug-Metabolizing Enzymes from the Carp, *Cyprinus carpio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19: 276-284.
- ROMEO, M., BENNANI, M., GNASSIA-BARELLI, M., LAFAURIE, M., and GIRARD, J.P., 2000. Cadmium and Copper Display Different Responses Towards Oxidative Stress in the Kidney of the Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 48(2-3): 185-194.
- SAHOO, A., SAMANTA, L., DAS, A., PATRA, S.K., and CHAINY, G.B.N., 1999. Hexachlorocyclohexane-Induced Behavioural and Neurochemical Changes in Rat. *Journal of Applied Toxicology*, 19: 13-18.
- SAKR, A.S., GABR, S.A., 1992. Ultrastructural Changes Induced by Diazinon and Neopybuthrin in Skeletal Muscles of *Tilapia nilotica*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 467-473.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1997. Response and Recovery of Brain Acetylcholinesterase in the European Eel, *Anguilla anguilla* Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38, 205-209.

- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., 1998. *In vivo* Inhibition of AChE Activity in the European Eel *Anguilla anguilla* Exposed to Technical Grade Fenitrothion, Comparative Biochemistry and Physiology, 120C: 389-395.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E., and GAMON, M., 1993. Bioconcentration and Excretion of Diazinon by Eel. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 50: 578-585.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., GAMON, M., and ANDREU-MOLINER, E., 1993. An Approach to the Diazinon Toxicity in the European Eel: Bioaccumulation Studies. The Science of The Total Environment, 461-468.
- SANCHO, E., FERRANDO, M.D., GAMON, M., and ANDREU-MOLINER, E.S., 1999. Fenitrothion Induced Changes in the European Eel Metabolism. Ecotoxicology and Environmental Restoration, 2(1): 7-13.
- SANTERRE, C.R., INGRAM, R., LEWIS, G.W., DAVIS, J.T., LANE, L.G., GRODNER, R.M., WEI, C.I., BUSH, P.B., XU, D.H., SHELTON, J., ALLEY, E.G., and HINSHAW, J.M., 2000. Organochlorines, Organophosphates, and Pyrethroids in Channel Catfish, Rainbow Trout, and Red Swamp Crayfish from Aquatic Facilities. Journal of Food Science, 65(2): 231-235.
- SAYEED, I., PARVEZ, S., PANDEY, S., BIN-HAFEEZ, B., HAQUE, R., RAUSIDDIN, S., Oxidative Stress Biomarkers of Exposure to Deltamethrin in Freshwater Fish, *Channa punctatus* Bloch. Ecotoxicology and Environmental Safety, (Baskıda).
- SHAKOORI, A.R., MUGHAL, A.L., and IQBAL, M.J., 1996. Effects of Sublethal Doses of Fenvalerate (A Synthetic Pyrethroid) Administered Continuously for Four Weeks on the Blood, Liver, and Muscle of a Freshwater Fish, *Ctenopharyngodon idella*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 57: 487-494.
- SOGORB, M.A., and VILANOVA, E., 2002. Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphorus, Carbamate and Pyrethroid Insecticides Through Hydrolysis. Toxicology Letters, 128: 215-228.

- STEGEMAN, J.J., SMOLOWITZ, R.M., and HAHN, M.E., 1991. Immunohistochemical Localization of Environmentally Induced Cytochrome P450IA1 in Multiple Organs of the Marine Teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 110: 486-504.
- STOREY, K.B., 1996. Oxidative Stress: Animal Adaptations in Nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 29(12): 1715-1733.
- STRATUS, L.D., CHAMBERS, E.J., 1995. Inhibition of Acetylcholinesterase and Aliesterases of Fingerling Channel Catfish by Chlorpyrifos, Parathion and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF). *Aquatic Toxicology*, 33: 311-324.
- SVOBODA, M., LUSKOVA, V., DRASTICHOVA, J., ZLOBEK, V., 2001. The Effect of Diazinon on Haematological Indices of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 70: 457-465.
- SZEGLETES, T., BALINT, T., SZEGLETES, Z. and NEMCSOK J. 1995. *In Vivo* Effects of Deltamethrin Exposure on Activity and Distribution of Molecular Forms of Carp AChE. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 31: 258-263.
- TAPPEL, M.E., CHAUDIERE, J. and TAPPEL, A.L., 1982. Glutathione Peroxidase Activities of Animal Tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73B(4): 945-949.
- THOMAS, P.C., and MURTHY, T.L., 1976. Studies on the Impact of a few Organic Pesticides on Certain Fish Enzymes. *Indian Journal of Animal Science*, 46(11): 619-624.
- TORRES, E., BUSTOS-JAIMES, I., LE BORGNE, S., Potential Use of Oxidative Enzymes for the Detoxification of Organic Pollutants. *Applied Catalysis B: Environmental*, (Baskıda).
- U.S. DEPARTMENT of HEALTH and HUMAN SERVICES, 1996. Toxicological Profile for Diazinon, Atlanta, 245s.
- ÜNER, N., ORUÇ, E.O., CANLI, M., and SEVGİLER, Y., 2001. Effects of Cypermethrin on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation on Liver and Kidney of the Freshwater Fish, *Oreochromis niloticus* and

- Cyprinus carpio* (L.). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 67: 657-664.
- VADHVA, P., and HASAN, M., 1986. Organophosphate Dichlorvos Induced Dose-Related Differential Alterations in Lipid Levels and Lipid Peroxidation in Various Regions of the Fish Brain and Spinal Cord. Journal of Environmental Science and Health, 21(5): 413-424.
- VALE, J.A., 1998. Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorus (OP) Insecticide Poisoning. Toxicology Letters, 102-103: 649-652.
- VAN DER WEL, H., and WELLING, W., 1989. Inhibition of Acetylcholinesterase in Guppies (*Poecilia reticulata*) by Chlorpyrifos at Sublethal Concentrations: Methodological Aspects. Ecotoxicology and Environmental Safety, 17: 205-215.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., LIVINGSTONE, D.R., and ORUNESU, M., 1991. Age-Related Lipid Peroxidation in the Digestive Gland of Mussels: The Role of the Antioxidant Defence Systems. Experientia, 47: 454-457.
- WATSON, A.M., WARREN, G., HOWARD, G., SHEDLOFSKY, S.I., and BLOUIN, R.A., 1999. Activities of Conjugating and Antioxidant Enzymes Following Endotoxin Exposure. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 13(2): 63-69.
- WHO, 1998. Environmental Health Criteria 198; Diazinon; Geneva, 138s.
- WINSTON, G.W., and DI GIULIO, R.T., 1991. Pro-oxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. Aquatic Toxicology, 19: 137-161.
- WRIGHT, J. B., HURLEY, M., WHITE, W.E., and LUSHINGTON, G., 2002. Interactions of Organophosphorus Compounds with Acetylcholinesterase: A QM, QM/QM and QM/MM Investigation, 23rd Army Science Conference, HO-05.
- YADWAD, V.B., KALLAPUR, V.L., and BASALINGAPPA, S., 1990. Inhibition of gill Na^+K^+ -ATPase Activity in Dragonfly Larva, *Pantala flavesens*, by Endosulfan. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 44: 585-589.

- YANG, P.Z., MORROW, J., AIPING, W., ROBERTS, L.J., DETTBARN, W.D.
1996. Diisopropylphosphorofluoridate-Induced Muscle Hyperactivity
Associated with Enhanced Lipid Peroxidation *In Vivo*. *Biochemical
Pharmacology*, 52: 357-361.
- YU, B.P., 1994. Cellular Defences Against Damage from Reactive Oxygen Species.
Physiological Reviews, 74(1): 139-162.
- ZELIKOFF, J.T., 1994. Fish Immunotoxicity. (J.H., Dean, M.I., Luster. Eds.)
Immunotoxicology and Immunopharmacology, Second Edition, Raven Pres.
Ltd., New York. 71-95.
- ZELIKOFF, J.T., RAYMOND, A., CARLSON, E., LI, Y., BEAMAN, J.R., and
ANDERSON, M., 2000. Biomarkers of Immunotoxicity in Fish: From the
Lab to the Ocean. *Toxicology Letters*, 112-113: 325-331.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden Biyolog ünvanı ile mezun oldum.

2001 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans tez çalışmama başladım, halen bu çalışmayı sürdürmekteyim.

