

**T.C.  
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FLUOKSETİN VE METABOLİTİ NORFLUOKSETİNİN *Daphnia magna*'DA PRO-OKSİDATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**SEVGİ BAŞALAN**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADİYAMAN, 2018**

**T.C.  
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FLUOKSETİN VE METABOLİTİ NORFLUOKSETİNİN *Daphnia magna*'DA PRO-OKSİDATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Sevgi BAŞALAN**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Genel Biyoloji Bilim Dalı**

Bu tez 06/09/2018 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından  
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER**  
**Danışman**

**Dr.Öğr.Üyesi Celal GÜVEN**  
**Üye**

**Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**  
**Üye**

**Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI**  
**Üye**

**Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ**  
**Üye**

**Prof. Dr. Refet KARADAĞ**  
**Enstitü Müdürü**

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

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

#### FLUOKSETİN VE METABOLİTİ NORFLUOKSETİNİN *Daphnia magna*'DA PRO-OKSİDATİF VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevgi BAŞALAN

Adıyaman Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

|                 |                                                                                                                                                |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Danışman        | : Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER                                                                                                                       |
| İkinci Danışman | : Dr.Öğr.Üyesi Celal GÜVEN                                                                                                                     |
| Yıl             | : 2018, Sayfa sayısı: 67 + XII                                                                                                                 |
| Jüri            | : Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER<br>Dr.Öğr.Üyesi Celal GÜVEN<br>Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI<br>Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI<br>Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ |

Bu çalışmada amacımız, ülkemizde ve dünyada yoğun kullanımı olan fluoksetin ve onun metaboliti norfluoksetinin, model organizma *Daphnia magna*'da pro-oksitatif ve pro-apoptotik etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla, juvenil *D. magna* örnekleri fluoksetin, norfluoksetin ve bunların karışımlarının çevresel derişimleri ile 10 katının etkisinde 21 gün süre ile bırakılmıştır. 17 günlük *D. magna* örnekleri de çevresel derişimlerinin 100 katının etkisinde 4 gün süre ile bırakılmıştır. Süre sonunda GPx ve tChE enzim aktiviteleri ile TBARS ve total protein miktarı spektrofotometrik yöntemlerle, mitokondriyal membran potansiyeli değişimi fluoresan boyama ile, sitokrom c ve ERK1/2 protein miktarları Western blot yöntemi ile, juvenillerde karapaks uzunluğu, maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğu mikroskobik yöntemler ile araştırılmıştır. Fluoksetin ve norfluoksetin kronik etkide çevresel derişimlerinde tChE aktivitesinde, yavru üretim düzeylerinde artışa, MMP depolarizasyonuna, juvenillerde karapaks uzunluğunda, maksimum karapaks genişliğinde ve kaudal spina uzunluğunda azalmaya yol açmıştır. Çevresel derişimlerinin 10 katının kronik etkisinde tüm etki gruplarında GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonu düzeyleri ile sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimlerinde artış meydana gelmiştir. En belirgin değişim norfluoksetin uygulaması ile dir. Norfluoksetin yavru üretme potansiyelini düşürmüştür. Subakut etkide de benzer değişimler olmakla birlikte total protein miktarında azalma da meydana gelmiştir. Sonuç olarak, fluoksetin ve norfluoksetin *D. magna*'da pro-oksitatif ve pro-apoptotik potansiyele sahiptir. *Daphnia spp.* ileri mekanistik araştırmalar sonucu değerli bilgiler sunma potansiyeline sahiptir.

**Anahtar Kelimeler:** Fluoksetin; Norfluoksetin; *Daphnia*; Apoptoz; Oksitatif Stres

## ABSTRACT

### MSc Thesis

#### INVESTIGATION of APOPTOTIC and PRO-OXIDATIVE EFFECTS of FLUOXETINE and NORFLUOXETINE on *Daphnia magna*

Sevgi BAŞALAN

Adiyaman University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

Supervisor : Assoc.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER  
Advisor : Assist.Prof.Dr. Celal GÜVEN  
Year : 2018, Number of pages: 67 + XII  
Jury : Assoc.Prof.Dr. Yusuf SEVGİLER  
Assist.Prof.Dr. Celal GÜVEN  
Prof.Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  
Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI  
Prof.Dr. Ahmet KAYRALDIZ

The aim of the present study is to investigate the pro-oxidative and pro-apoptotic potential of fluoxetine, a widely used antidepressant in Turkey and world, and its metabolite norfluoxetine on a model organism, *Daphnia magna*. Juvenile *D. magna* specimens were exposed to environmentally-related, and their 10 fold concentrations of fluoxetine, norfluoxetine, and their mixtures for 21 days. 17 days old *D. magna* specimens were also exposed to 100 fold of environmentally related concentrations of these toxicants and their mixtures for 4 days. After the exposure periods, GPx and tChE enzyme activities, TBARS and total protein contents were analysed spectrophotometrically, mitochondrial membrane potential was analysed by fluorescence staining, cytochrome *c* and ERK1/2 protein contents were analysed by Western blotting, and carapace length, maximum carapace width, caudal spine length were analysed microscopically. At the environmentally-related concentrations, fluoxetine and norfluoxetine caused an increase in tChE enzyme activity and parturition rate; however, a decrease in juvenile carapace length, maximum carapace width, and caudal spine length. MMP depolarization also occurred. At the 10 fold of environmentally-related concentrations, GPx activity and lipid peroxidation levels, cytochrome *c* and ERK1/2 protein contents were increased. The most pronounced effect was observed in norfluoxetine-exposed *D. magna*. Norfluoxetine decreased the parturition rate. The similar was also observed in the subacute exposure; moreover, total protein contents decreased. Consequently, fluoxetine and norfluoxetine have pro-oxidative and pro-apoptotic potential in *D. magna*. *Daphnia spp.* have a potential to introduce precious mechanistic knowledge.

**Key Words:** Fluoxetine; Norfluoxetine; *Daphnia*; Apoptosis; Oxidative Stress

## **DESTEKLER**

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEFYL/2015-0003 numaralı proje ile desteklenmiştir.



## BEYAN

“Fluoksetin ve Metaboliti Norfluoksetinin *Daphnia magna*’da Pro-Oksidatif ve Apoptotik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı tezimde çalışmaların tamamen akademik kurallara ve etik değerlere sadık kalınarak yürütüldüğünü ve yazımda yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Sevgi BAŞALAN

imza

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince değerli yardım ve desteklerini esirgemeyen tez danışmanlarım Sayın Doç.Dr. Yusuf SEVGİLER'e ve Sayın Dr.Öğr.Üyesi Celal GÜVEN'e; tez çalışmam için gerek analiz gerekse de yazım sürecinde değerli katkılarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. Eylem TAŞKIN GÜVEN'e, *Daphnia magna* örneklerinin kültürü ve morfometrik analizler konusunda değerli yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş.Gör.Dr. Serdar SÖNMEZ'e, Biyoloji Bölümü laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr. E. Rıdvan SIVACI'ya, Adıyaman Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı olanaklarından faydalanmamı sağlayan başta Müdür Sayın Prof.Dr. Hasan SOLMAZ ve Müdür Yardımcısı Sayın Dr.Öğr.Üyesi Aysel ALKAN UÇKUN olmak üzere tüm çalışanlarına, floresan *in vivo* görüntülemeledeki yardımlarından ötürü başta Sayın Uzman Biyolog Seher KURU olmak üzere Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim ve Araştırma Merkezi yönetici ve çalışanlarına, çalışma materyalim olan *D. magna* örneklerinin yurtdışından temini için gereken yazışmalar konusundaki yardımlarından ötürü Adıyaman Üniversitesi Rektörlük personeline ve başta Uzman Biyolog Dilek KOÇ olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                 |      |
|---------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET.....                                                                       | I    |
| ABSTRACT.....                                                                   | II   |
| DESTEKLER.....                                                                  | III  |
| BEYAN.....                                                                      | IV   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                   | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                               | VI   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                         | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                            | IX   |
| RESİMLER DİZİNİ.....                                                            | X    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                    | XI   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                  | 1    |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                       | 11   |
| 3. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                                      | 16   |
| 3.1. Materyal .....                                                             | 16   |
| 3.1.1. Kimyasal Maddeler .....                                                  | 17   |
| 3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....                                          | 18   |
| 3.2. Yöntem.....                                                                | 19   |
| 3.2.1. Toksisite Denemeleri .....                                               | 19   |
| 3.2.1.1. Toksisite Denemeleri İçin <i>D. magna</i> Anaçlarının Bakımı .....     | 19   |
| 3.2.1.2. Kronik Toksisite Denemeleri .....                                      | 20   |
| 3.2.1.3. Subakut Toksisite Denemeleri .....                                     | 22   |
| 3.2.2. Biyokimyasal Analizler.....                                              | 23   |
| 3.2.2.1. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi .....                                     | 23   |
| 3.2.2.2. Total Kolinesteraz Yöntemi .....                                       | 25   |
| 3.2.2.3. TBARS Yöntemi .....                                                    | 26   |
| 3.2.2.4. Protein Yöntemi .....                                                  | 28   |
| 3.2.2.5. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ( $\Delta\Psi_m$ ) Ölçülmesi..... | 29   |
| 3.2.2.6. Sitokrom c ve ERK1/2 Protein Derişimlerinin Belirlenmesi .....         | 30   |
| 3.2.2.7. Morfometrik Analizler .....                                            | 31   |
| 3.2.3. İstatistiksel Analizler.....                                             | 31   |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA .....                                                   | 33   |
| 4.1. Bulgular.....                                                              | 33   |



|                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.1. Fluoksetin ve Metaboliti Norfluoksetinin Kronik Etkisinde                                                 |    |
| <i>D. magna</i> 'da Ölçülen Değişimler.....                                                                      | 33 |
| 4.1.1.1. Biyokimyasal Değişimler .....                                                                           | 33 |
| 4.1.1.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom c ve ERK1/2<br>Protein Derişimlerindeki Değişimler ..... | 34 |
| 4.1.1.3. Morfometrik Değişimler .....                                                                            | 37 |
| 4.1.1.4. Yavru Üretme Potansiyeline Etkiler.....                                                                 | 38 |
| 4.1.2. Fluoksetin ve Metaboliti Norfluoksetinin Subakut Etkisinde                                                |    |
| <i>D. magna</i> 'da Ölçülen Değişimler.....                                                                      | 39 |
| 4.1.2.1. Biyokimyasal Değişimler .....                                                                           | 39 |
| 4.1.2.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom c ve ERK1/2<br>Protein Derişimlerindeki Değişimler ..... | 44 |
| 4.2. Tartışma.....                                                                                               | 46 |
| 5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....                                                                                        | 57 |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                  | 59 |
| KİŞİSEL BİLGİLER.....                                                                                            | 69 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|             |                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1 | Glutasyon peroksidaz yöntemi .....                                                                                                                                                                                                                  | 25 |
| Çizelge 3.2 | Total kolinesteraz yöntemi.....                                                                                                                                                                                                                     | 26 |
| Çizelge 4.1 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <i>D. magna</i> 'da GPx ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değişimler ..... | 35 |
| Çizelge 4.2 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <i>D. magna</i> <24 saat yavrularının karapaks, maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğundaki değişimler .....               | 41 |
| Çizelge 4.3 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisindeki <i>D. magna</i> 'nın yavru üretme potansiyelinde meydana gelen değişimler .....                                                        | 42 |
| Çizelge 4.4 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde <i>D. magna</i> 'da GPx ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değişimler .....           | 43 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1 <i>Daphnia magna</i> örneklerinin ileri analizler için uygun olup olmadığını anlamak üzere yapılan EC <sub>50</sub> duyarlılık testinin grafiği .....                                                     | 21 |
| Şekil 3.2 TBARS standart grafiği .....                                                                                                                                                                              | 28 |
| Şekil 3.3 Protein standart grafiği .....                                                                                                                                                                            | 29 |
| Şekil 4.1 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <i>D. magna</i> 'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişiminin kontrole göre yüzde değişimi..... | 37 |
| Şekil 4.2 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde <i>D. magna</i> 'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişiminin kontrole göre yüzde değişi.....             | 45 |

## RESİMLER DİZİNİ

|           |                                                                                                                                                                                                          |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resim 1.1 | Fluoksetinin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                       | 2  |
| Resim 1.2 | Norfluoksetinin kimyasal yapısı .....                                                                                                                                                                    | 3  |
| Resim 1.3 | Juvenil <i>D. magna</i> (4X) .....                                                                                                                                                                       | 5  |
| Resim 1.4 | Lipid peroksidasyonu zincir tepkimesinin başlama, ilerleme ve sonlanma basamakları .....                                                                                                                 | 8  |
| Resim 4.1 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <i>D. magna</i> 'da mitokondriyal membran potansiyeli değişimi analizine ait görüntüler ..... | 34 |
| Resim 4.2 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <i>D. magna</i> 'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimi analizine ait jel görüntüleri ..... | 36 |
| Resim 4.3 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde <i>D. magna</i> 'da mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimler .....              | 44 |
| Resim 4.4 | Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde <i>D. magna</i> 'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimi analizine ait jel görüntüleri .....           | 45 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

|                                     |                                                              |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| cm                                  | : Santimetre                                                 |
| dak                                 | : Dakika                                                     |
| L                                   | : Litre                                                      |
| M                                   | : Molar                                                      |
| m                                   | : Metre                                                      |
| mg                                  | : Miligram                                                   |
| mL                                  | : Mililitre                                                  |
| mM                                  | : Milimolar                                                  |
| $\mu\text{mol}$ ya da $\mu\text{M}$ | : Mikromolar                                                 |
| $\mu\text{g}$                       | : Mikrogram                                                  |
| $\mu\text{m}$                       | : Mikrometre                                                 |
| $\mu\text{S}$                       | : Mikrosiemens                                               |
| nmol                                | : Nanomolar                                                  |
| nm                                  | : Nanometre                                                  |
| s                                   | : Saniye                                                     |
| $^{\circ}\text{C}$                  | : Santigrad derece                                           |
| $g$                                 | : Deniz seviyesinde Dünya'nın hareketi ile oluşan temel ivme |
| U                                   | : Ünite                                                      |
| $\epsilon$                          | : Ekstinksiyon katsayısı                                     |
| v/v                                 | : Hacim/hacim                                                |
| w/v                                 | : Ağırlık/hacim                                              |
| %                                   | : Yüzde                                                      |
| <                                   | : Küçük                                                      |
| >                                   | : Büyük                                                      |

## Kısaltmalar

|                               |                                                                  |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| AgNO <sub>3</sub>             | : Gümüş Nitrat                                                   |
| ASTM                          | : American Society for Testing and Materials                     |
| BSA                           | : Sığır Serum Albumini                                           |
| CaCO <sub>3</sub>             | : Kalsiyum Karbonat                                              |
| Ca                            | : Kalsiyum                                                       |
| Cd                            | : Kadmiyum                                                       |
| ERK                           | : Ekstraselüler Sinyal ile Düzenlenen Kinazlar                   |
| EC <sub>50</sub>              | : Efektif Derişim %50                                            |
| FBE                           | : Fen Bilimleri Enstitüsü                                        |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen Peroksit                                              |
| HgCl <sub>2</sub>             | : Civa Klorür                                                    |
| JNK                           | : c-Jun N-terminal Kinaz                                         |
| LC <sub>50</sub>              | : Letal Derişim %50                                              |
| MMP                           | : Mitokondriyal Membran Potansiyeli                              |
| MPTP                          | : Mitokondriyal Membran Permeabilite Değişim Poru                |
| MAPK                          | : Mitojen ile Aktive Olan Kinazlar                               |
| Ni                            | : Nikel                                                          |
| PVDF                          | : Poliviniliden Diflorür                                         |
| PBS                           | : Fosfat ile Tamponlanmış Serum Fizyolojik Çözeltisi             |
| PBS-T:                        | : Tris İçeren Fosfat İle Tamponlanmış Serum Fizyolojik Çözeltisi |
| ROS                           | : Reaktif Oksijen Türleri                                        |
| SAPK                          | : Stresle Aktive Olan Protein Kinaz                              |
| TBA                           | : Tiyoarbiturik Asit                                             |
| TBARS                         | : Tiyoarbiturik Asit Reaktif Maddeleri                           |
| TiO <sub>2</sub>              | : Titanyum Dioksit                                               |
| vd                            | : ve diğerleri                                                   |
| 4X                            | : 4 Kat                                                          |
| 10X                           | : 10 Kat                                                         |
| 100X                          | : 100 Kat                                                        |

## 1. GİRİŞ

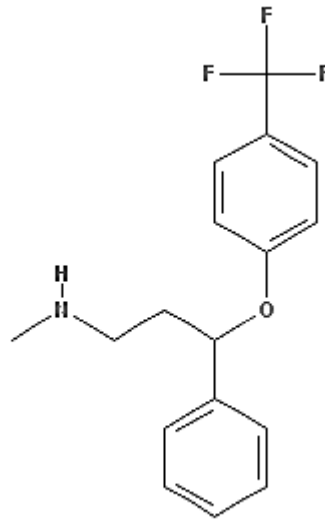
Sucul ortamlara karışan farmasötik kimyasalların insan sağlığı ve ekosistem üzerine olası etkileri konusunda endişeler artmakta ve toplum bu konuya dikkatini yoğunlaştırmaktadır. Geçen yüzyıl boyunca bilimdeki gelişmeler, insan sağlığını ve yaşam kalitesini artırmak üzere yeni farmasötiklerin keşfi ya da geliştirilmesini olası kılmıştır. Analitik teknolojideki paralel ilerlemeler de bu ve pestisitler gibi kimyasalların çok düşük düzeylerde olsalar dahi sudaki varlığını belirleyebilmemize olanak tanımıştır [1]. Farmasötik kimyasalların çevrede bulunurlukları ve etkilerine ilişkin yoğun araştırmalar 1990'ların başında başlamış ve o zamandan günümüze birçok araştırma sonucu yayınlanmıştır [2]. Bu bileşikler küresel olarak hemen tüm yüzey sularında belirlenmekte ve ekolojik etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir [3, 4]. Çevrede belirlenen derişimleri genellikle  $\mu\text{g/L}$  gibi oldukça düşük düzeyde olmasına karşın, ekolojik etkilerinin yeterince anlaşılamaması, çevrede flora ve fauna ve insan sağlığına potansiyel etkilerine ilişkin endişeyi artırmaktadır [5]. Atık taşıma sistemlerine boşaltılan bu kimyasallar, çevrede ana bileşik olarak bulunabilecekleri gibi metabolitleri ya da konjugatları şeklinde de yer alır [6]. Nispeten polar bileşikler olup atık su işleme sistemleri ile tamamen uzaklaştırılamazlar [6, 7].

Farmasötik kimyasallar farklı fiziko-kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptir [2]. Cooper vd., bu kimyasalları farklı fizikokimyasal ve toksikolojik verileri temel olarak risk kategorilerinde gruplamıştır [8]. Psikoterapötikleri de kapsayan merkezi sinir sistemi hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve ilişkili ilaçlar ile anti-infektif ilaçlar yüksek toksik karakterleri ile bunlar arasında çevre için en tehlikeli grubu oluşturmaktadır. Merkezi sinir sistemine etkili antidepresanlar olan selektif serotonin geri kazanım inhibitörleri (SSRI), vahşi yaşam üzerine potansiyel etkileri olabilecek kimyasallar içerisinde yer almaktadır [9].

Çalışmamızda çevresel etkilerini araştırdığımız fluoksetin, SSRI olarak bilinen yeni nesil antidepresan ilaçlar arasında, bilinen ilk moleküllerden bir tanesidir [10]. 1987 yılında ruhsatlandırılmış ve bu zamandan sonra kullanımı yaygınlaşmıştır [11]. Ülkemizde 2012 yılı sonu itibarıyla 26.60 milyon reçete ile toplam 37.35 milyon kutu antidepresan ilaç satıldığı belirlenmiştir [12]. Yazarlar bu satış oranının

aşırı ve gereksiz kullanım nedeniyle olduğunu öne sürmektedir. 2008>2016 yılları arasında ise, ülkemizde her 1000 kişi içerisinde, 27.8>41 günlük doz alımı aralığında, artan bir şekilde antidepresan kullanımı gerçekleşmiştir [13].

Serotonin geri-kazanım inhibitörleri içerisinde yıllar boyunca çok satılmış ve satılmakta olan fluoksetin (IUPAC adı: *N*-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amine; CAS No: 54910-89-3) selektif olarak serotonin geri kazanım mekanizmasını inhibe eder. Kimyasal yapısı şu şekildedir:



Resim 1.1 Fluoksetinin kimyasal yapısı [14]

Moleküler Ağırlığı: 309.332 g/mol

Oda koşullarında fiziksel durumu: Katı

Erime Noktası: 179-182°C

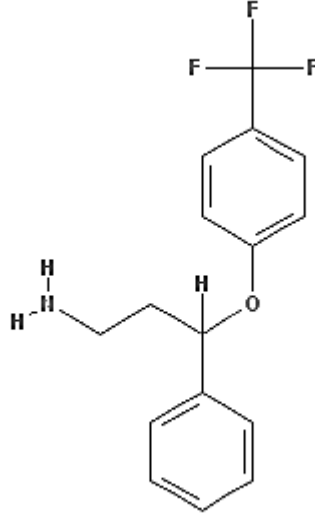
Suda çözünürlüğü: 25°C’de 50 mg/mL

K<sub>ow</sub>: 4.60

Fluoksetin, memelilerde oral alınımını takiben gastrointestinal kanaldan etkili bir şekilde absorbe edilir. Karaciğerde ilk faz metabolizması sonrası, yüksek lipofilitesi nedeniyle plazma proteinlerine bağlanır ve vücuda dağılır. İlk faz metabolizması sitokrom P450C9 (CYP2C9), CYP2C19 ve CYP3A etkisi ile gerçekleşir. En önemli tepkime *N*-demetilasyondur ve açığa norfluoksetin (IUPAC



adı: 3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl) phenoxy] propan-1-amine; CAS No: 83891-03-6) çıkar [15]. Norfluoksetinin kimyasal yapısı şu şekildedir:



Resim 1.2 Norfluoksetinin kimyasal yapısı [16]

Norfluoksetin de ana bileşiğin yaptığı gibi SSRI olarak etkilidir; fakat, etkisi ana bileşiğe göre çok daha fazladır. Her iki bileşiğin yarı ömrü uzundur; fakat, norfluoksetinin yarı ömrü (7-15 gün), fluoksetine (1-3 gün) oranla daha yüksektir. Fluoksetin ve norfluoksetin ya glukuronidlerine ya da etkisiz diğer metabolitlere dönüştürülür. İnsanlarda alınımını takiben yaklaşık 30 gün içerisinde, alınan dozun yaklaşık %75'i idrarla, %10 kadarı feçes ile atılır [15]. İnsan vücudundan büyük ölçüde glukuronid formunda atılır ve bu form, atık işleme tesislerinde yeniden ana bileşiğe dönüşür [17].

Merkezi sinir sisteminde nöroiletici serotonin (5-hydroxytryptamine; IUPAC adı: 3-(2-aminoethyl)-1H-indol-5-ol; CAS No: 50-67-9) hormonal ve nöronal birçok mekanizmada yer alır. Besin alımı ve cinsiyete özgü davranışlarda da önemli rol oynar. Bir pompa aracılığıyla bu nöroiletici, presinaptik alana geri alınır [18] ve etkisi sonlanır. Serotonin ve bunun almaçları birçok sucul omurgasızda bulunur ve örneğin *Dreissena polymorpha* gibi midyelerde yumurta olgunlaşması ve yumurta dökme gibi üreme işlevlerinde önemli rol oynar [19]. Crustacea altşubesi üyelerinde

serotonin lokomotor aktivitenin düzenlenmesinde, nöromuskular iletimde, osmoregülasyonun, agresyonun ve erişkin nöroenezinin kontrolünde önemli bir role sahiptir [20, 21]. Ayrıca kardiyo/vaso-aktiftir, nöral devre aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır [21]. Hiperglisemik hormon, kırmızı/siyah pigment dağıtıcı/yoğunlaştırıcı hormon, nörodepresan hormon, kabuk değiştirme hormonu ve gonad uyarıcı hormon gibi diğer hormonların salınımını uyarır [22]. Bu nedenle serotonin aktivitesini değiştiren herhangi bir kimyasal dolaylı olarak bu organizmalarda normal endokrin ve biyolojik işlevleri değiştirme potansiyeline sahiptir. Serotonin bulunurluğunun artışı sonucu omurgasızlarda endokrin sistemde meydana gelen düzensizlik ile yavru üretim sayısında artış meydana gelebilmektedir [3]. *Daphnia* türlerinde de serotonin ve işlevsel olarak ilişkili proteinlerin varlığı farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur [23, 24].

Sanderson vd., farmasötiklerin farklı türlerden elde edilen  $EC_{50}$  değerlerine göre yapılan istatistiksel kantitatif risk değerlendirme analizine göre *Daphnia* ve *Ceriodaphnia* gibi cins bireylerinin tahmin edilen en duyarlı türler olduğunu belirtmiştir [25]. Çalışmamızda kullandığımız *Daphnia magna* Straus, 1820, (Daphniidae, Anomopoda, Cladocera, Phyllopoda, Crustacea) OECD tarafından sucul çevresel toksisite testlerinde standart model organizma olarak kabul edilen türlerden bir tanesidir [26]. İçme suyu kalitesinin belirlenmesinde kullanılan ilk canlılardır ve daha sonraları akuatik toksikoloji çalışmalarında çeşitli çevresel koşulların indikatörü olarak yaygın kullanılan organizmalardan biri haline gelmiştir [27]. Arktik ve ılıman göller, yüksek rakımlı göller, kısa ömürlü (ephemeral) göller, kumul tepeler arasında kalan göller gibi birçok tatlı su habitatının pelajik bölgelerinde yaşayan sucul bir türdür. Tatlı su sistemlerinde üreticiler ile üst trofik düzeyler arasında anahtar bağlantı noktalarından birini oluşturur [26]. Poliembriyonik bir tür olarak başlıca partenogenez ile çoğalır ve serbest yaşayan formlar herhangi bir larval dönemden geçmez. Koşulların uygun olduğu zamanlarda diploid dişiler, diploid yumurtalar üretir ve bu yumurtalar, yumurta kesesi denen bir yapı içerisinde dişi vücudunda taşınır. Çevresel koşulların uygun olmadığı zamanlarda partenogenetik üreme yerini gamogenetik (biseksüel) versiyona bırakır. Dişinin yumurta kesesi içerisinde erkek yumurtalar da yer alır. Biseksüel üreme

sonucu “ephippia” adı verilen güçlendirilmiş kabuk ile çevrili bir yumurta oluşturulur. Annedeki yağ dokusundan üretildikleri için annede yağ biriktirmeyi değiştiren koşullar yumurta üretim sayısını da etkilemektedir. Bir *D. magna* anacı bir seferde 15’e kadar yavru verebilir ve bu durum herhangi bir toksikantın varlığı ya da diğer çevresel koşullardan etkilenmektedir. Anacın vücut büyüklüğü ile yumurta üretme sayısı arasında pozitif bir ilişki bulunmaktadır. Juvenil bireyler birkaç kez kabuk değiştirirler ve her kabuk değişimi vücut büyüklüğünde artışa yol açar [27], (Resim 1.3).

*Daphnia* türleri kısa sürede tek bir anneden fazlaca yavru elde edilebildiği için toksikoloji çalışmalarında gözde organizmalardan biri haline gelmiştir [3].



Resim 1.3 Juvenil *D. magna* (4X)

*Daphnia* türlerinde en çok araştırılan biyokimyasal parametrelerden bir tanesi kolinesterazlardır (ChE). İki tip kolinesteraz tanımlanmıştır. İlki asetilkoline yüksek afinite gösteren asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7) ve diğeri butirilkoline afinite gösteren ve non-spesifik esteraz ya da psödokolinesteraz olarak da bilinen butirilkolinesterazdır (BChE; EC 3.1.1.8). AChE sinaptik alanda asetilkolini asetat ve koline hidrolize ederek nöronal uyarımın sürekli hale gelmesini engeller. Böylece yaşamsal önemdeki duyuşsal ve nöromuskuler işlevler normal olarak yerine getirilir

[28]. BChE süksinilkolin, prokain ve kokain gibi birçok eksojen substratın detoksifikasyonunu sağlar. Substrat spesifite aralığı AChE'ye göre daha geniştir. Fakat, tam fizyolojik işlevi hala anlaşılamamıştır. Sinir sisteminde ve nöromusküler bağlantılarda iki tip asetilkolin reseptörü vardır: Muskarinik asetilkolin reseptörleri ve nikotinik asetilkolin reseptörleri. Asetilkolin reseptörleri endotelial ve immun sistem hücreleri gibi birçok hücre tarafından da ifade edilir [29]. Günümüzde 40 farklı primer hücre kültürü ya da hücre hattında apoptoz sırasında AChE protein ifadenmesi olduğu belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerde *in vitro* ya da *in vivo* aktivite ya da ifadenme artışı nedeniyle AChE'nin apoptoz belirteci olarak kullanılması önerilmektedir. Her ne kadar AChE apoptozun başlatıcı bileşeni değilse de aşırı AChE ifadenmesi yapan hücreler kontrole oranla daha kolay apoptoza uğramaktadır. Apoptozom oluşumunda önemli bir rolü vardır ve AChE geninin susturulması kaspaz-9 aktivasyonunu engeller.

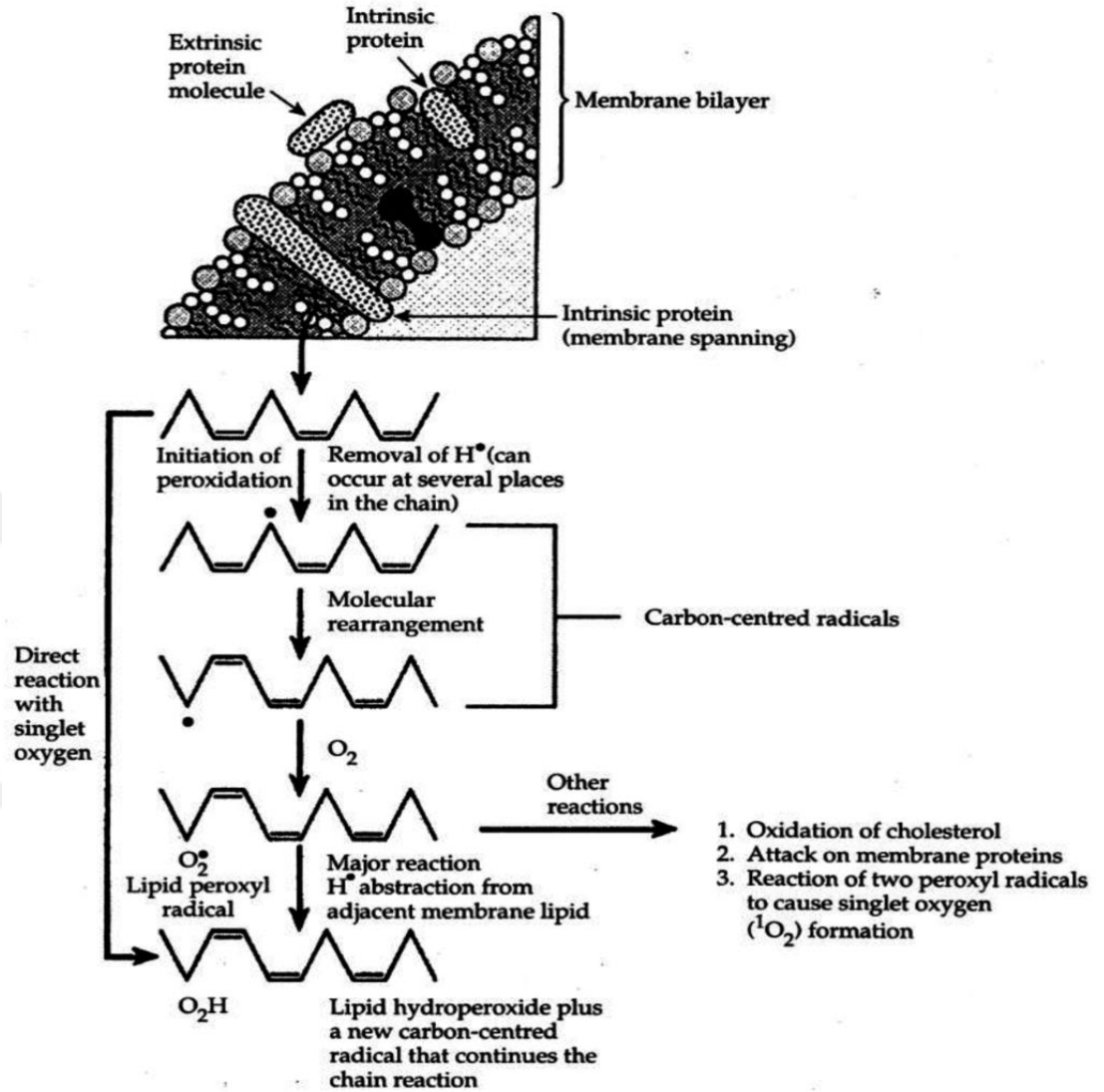
Canlıları çevreleyen ortam genellikle oksidatif koşullarla karakterize edilirken intraselüler redoks durumu indirgeyici ajanların varlıkları ile sürdürülmektedir. Böyle bir redoks homeostazı vital hücresel işlevler için önemlidir ve bu homeostazın kaybolması durumunda, reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artış ile ilişkilendirilen lipidler, DNA ve proteinlerde oksidatif hasar meydana gelmektedir. Hücresel redoks durumunun sürdürülmesi DNA sentezi, gen ekspresyonu, enzim aktiviteleri, vd. gibi olaylarda önemli rol oynamaktadır. Bunun yanında, intraselüler içeriğin ve moleküllerin her birinin redoks durumundaki değişimler stres olarak adlandırılan hücredeki farklı süreçlerin düzenlenmesinde yer alan intrinsik hücresel aktivitelerde değişime neden olmaktadır [30]. ROS, aslında fizyolojik değişimlerinde  $Ca^{2+}$  ile birlikte önemli sinyal molekülleri olarak görevlidir [31].

Aerobik solunumla doğal olarak oluşan ROS miktarına, ilaçlar, kimyasallar ve ağır metaller katkıda bulunmaktadır. Bu radikaller, hücrenin adaptasyon mekanizması kapsamında katalaz (CAT; EC 1.11.1.6), glutatyon peroksidaz (GPx; EC 1.11.1.9) ve süperoksit dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) gibi enzimleri içeren antioksidant savunma ile uzaklaştırılmaktadır [32].

Glutatyon peroksidazlar, tüm organizmalarda yer alan önemli bir oksidoredüktaz enzim ailesini oluşturur. Aktif merkezlerinde sistein ya da

selenosistein içerirler. Sistein içeren versiyonları prokaryotlar, mayalar ve karasal bitkilerde yer alırken selenosistein içerenler özellikle memelilerde yer alır. En önemli substratları hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ); fakat, organik hidroperoksidleri de substrat olarak kullanırlar. İki tiyol grubunun oksidasyonu (tiyol grupları, en önemli intraselüler antioksidant molekül olan redükte glutatyon, GSH'dan sağlanır) sonucu iki elektronlu indirgeme ile substratlarının reaktifliklerini azaltırlar. Bu şekilde kuvvetli pro-oksidant karaktere sahip diğer ROS'ların oluşumunu engellerler. Örneğin, GPx katalizli tepkime ile  $H_2O_2$  suya dönüştürülür. Açığa çıkan bir diğer ürün okside glutatyon (GSSG)'dur [33].

Oluşumu sağlayan prooksidant süreçler ile bu radikallerin temizlenmesini sağlayan antioksidant savunma arasında bir dengesizlikle açığa çıkan oksidatif stres sırasında ROS, proteinler, lipidler ve nükleik asitlerin oksidatif modifikasyonlarına neden olmaktadır [34]. ROS, membranda yer alan lipidlerden elektron çalarak karbon merkezli radikallerin oluşumunu başlatır. Oluşan karbon radikali molekül içi yeniden düzenleme ile konjuge dienleri oluşturur. Fakat, aerobik koşullarda karbon radikali  $O_2$  ile karşılaşırsa bununla birleşerek bir peroksil radikali açığa çıkartır. Peroksil radikali komşu yağ asidinden hidrojen çalarak kendisi lipid hidroperoksidine dönerken bu tepkime zincir halini alarak çok fazla sayıda peroksid molekülünün oluşturulması ile sonlanabilir. Lipid peroksidleri biyolojik olarak aktiftirler. Düşük derişimlerinde  $H_2O_2$  gibi hücre proliferasyonunu uyarırken, yüksek derişimlerinde proliferasyonu bloke eder ve hatta daha yüksek derişimlerde apoptoz ve nekroz gibi hücre ölümü olaylarının başlamasına yol açar [35]. Poliansatüre yağ asitlerince zengin olan hücre ve organel membranlarında bulunan lipidlerin oksidatif modifikasyonları ile hücrelerin bir ve iki valanslı elektronlara geçirgenliği artmakta, membran enzimleri inhibe olmakta ve hatta lizozim gibi yapıların içeriği boşaltılarak hücrenin sindirimi başlamaktadır. Bu nedenle biyolojik membranlardaki peroksidasyonun kontrol edilememesi membran yapısı ve işlevini bozarak hücrenin ölümüne neden olmaktadır [34]. Lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde oksidatif stresin önemli bir indikatörü olması bakımından tiyobarbiturik asit reaktif maddelerinin (TBARS) analizi yaygın olarak kullanılmaktadır [36]. TBARS oluşum mekanizmasının genel şeması Resim 1.4'de görülmektedir.



Resim 1.4 Lipid peroksidasyonu zincir tepkimesinin başlama, ilerleme ve sonlanma basamakları [35]

Hücreler, stresin şiddetine göre yanıt mekanizmalarını aktive edebildikleri gibi tolerans limitlerinin aşılması durumunda hücre ölüm mekanizmasını da başlatabilmektedirler [37]. Apoptozis olarak da adlandırılan programlanmış hücre ölümü tüm canlılarda yüksek derecede korunmuş, spesifik biyokimyasal ve morfolojik değişimlerin yer aldığı belirli süreçlerin ardışık aktivasyonları ile oldukça kompleks bir mekanizmadır. Apoptozisin başlangıç aşaması hücre redoks potansiyelindeki değişim, başlatıcı kaspazların aktivasyonu, hücrenin büzülmesi,

membran lipid asimetrisinin kaybı ve kromatin yoğunlaşması ile karakterize edilir. Daha ileri aşamalarda yürütücü kaspazların ve endonükleazların aktivasyonu ile apoptotik yapıların oluşumu ve hücrenin parçalara ayrılması görülmektedir. Apoptozis ya intrinsik ya da ekstrinsik süreçlerle aktive edilmektedir [38].

Mitokondriyal süreç olarak da adlandırılan intrinsik süreç, çok farklı sitotoksik uyartılar ya da çevresel stres faktörleri tarafından başlatılabilmektedir ve birtakım proteinlerin etkileri ile bu süreç düzenlenmektedir. Bunlardan anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL, Bax ve Bak denilen apoptotik proteinleri inhibe etmektedir. Bax ve Bak dış mitokondriyal membranın geçirgenliğini artırarak sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımına ve apoptozom kompleksi oluşumunu teşvik ederek dolaylı olarak başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonuna neden olmaktadır [38]. Başlatıcı kaspaz-9'un aktivasyonu yürütücü kaspaz-3'ün aktivasyonu ile birlikte apoptozisin ilerlemesini sağlamaktadır [39].

Sitokrom c küçük, çözünebilir bir hem proteindir ve özellikle ferrik formunda oldukça esnek bir yapıya sahiptir. Spesifik koşullara, etkileşimlere ve hücrel lokalizasyona bağlı olarak farklı konformasyonları stabil hale gelebilir ve bu durum yapısını, redoks özelliklerini, bağlanma afinitesini ve enzim aktivitesini etkiler. Asıl işlevi oksidatif fosforilasyonda elektron alışverişini sağlamaktır ve sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin intermembran alanında yer alır. Sitokrom c'nin mitokondri dışına salınımı intrinsik apoptotik süreci başlatır ve sitokrom c nükleus içerisine geçerek nükleozom kompleksini engeller [40]. Sitokrom c'nin mitokondri dışına salınımı mitokondriyal membran permeabilite değişim porunun (MPTP) oluşumu ile ilgilidir. Bu por memelilerde  $Ca^{2+}$  düzeylerine duyarlı bir şekilde meydana gelir. Memelilerden farklı olarak Crustacea'lerde  $Ca^{2+}$  ile düzenlenen işlevsel bir MPTP yapısına rastlanılamamıştır. Bu durum, apoptozdan kaçınmak için yararlı bir mekanizma olarak görülmektedir. Buna karşın, bu canlılarda apoptozun düzenlenme mekanizması yeterince aydınlatılmadığından moleküllerin apoptozdaki rolü hakkında net bir fikir öne sürmek mümkün olmamaktadır [41].

Protein kinazlar hücre biyolojisinde yer alan nerdeyse tüm işlevler için baskın bir düzenleyici role sahiptir. Bir fosforil ( $PO_3^{2-}$ ) grubunu proteinin aminoasit rezidüsündeki -OH grubuna bağlarlar ve bu nedenle serin/treonin protein kinazlar ya

da tirozin protein kinazlar ve tirozin-kinaz benzeri proteinler olarak gruplandırılırlar. Memelilerde mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK) sitoplazmik serin/treonin protein kinazlardır ve hücre yüzeyindeki sinyallerin hücre içinde dönüştürülmesi işlevlerini gerçekleştirirler. Bu grupta yer alan proteinler ekstraselüler sinyal ile düzenlenen kinaz (ERK) ailesi, p38 kinaz ailesi ve c-Jun N-terminal kinaz (JNK ya da SAPK) ailesini kapsar. Aktive olan MAPK'lar transkripsiyon faktörleri, protein kinazlar ve fosfatazlar ve diğer işlevsel proteinlerin fosforilasyonunu kataliz eder. İnsan ERK1 ve ERK2'si %84 sekans benzerliği gösterir bu nedenle ERK1/2 olarak da bilinir. Neredeyse tüm protein kinazlar gibi ERK1/2 de benzersiz N- ve C-terminal eklentilerine sahiplerdir ki bu eklentiler sinyalleme mekanizmasındaki özgüllüğü sağlar. Bilinen tüm hücresel uyaranlar ERK1/2 yolağında ERK1 ve ERK2'nin paralel aktivasyonunu sağlar. ERK1/2 her hücrede ifadelenen hidrofilik reseptör olmayan proteinlerdir ve Ras-Raf-MEK-ERK sinyal dönüşüm kaskadına, bir diğer adıyla MAPK kaskadı, katılırlar. Bu kaskad, hücre adezyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre göçü, hücre sağkalımı, farklılaşma, metabolizma, proliferasyon ve transkripsiyon gibi çok farklı işlevlerin düzenlenmesi işine katılır [42]. ERK1/2, pro-apoptotik moleküllerin fosforilasyon ile aktivitesini ya da transkripsiyonel düzeyde bu proteinlerin ifadeleneşini azaltarak anti-apoptotik etkiler gösterir. Ayrıca anti-apoptotik moleküllerin aktivitesini artırarak ya da transkripsiyonlarını uyararak da hücre sağkalımını destekler. Aksine, pro-apoptotik etki ile hücre ölümünü teşvik ettiğı de bilinmektedir, fakat mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır [43].

Çalışmamızda amacımız ülkemizde ve dünyada gittikçe artan oranda kullanılan fluoksetin, metaboliti norfluoksetin ve bunların karışımlarının çevresel ve çevresel derişimlerinin 10 katının kronik ve çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde model organizma *D. magna*'da pro-oksidatif ve pro-apoptotik etkilerinin araştırılmasıdır. Farklı derişimlerinde ve farklı sürelerde fluoksetinin pro-oksidatif potansiyeli *D. magna*'da gösterilmiştir [44]. Fakat, metabolit norfluoksetinin ve fluoksetin ile karışımının bu canlı türünde pro-oksidatif ve pro-apoptotik etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır.



**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**

İdrar ile atılan farmasötik bileşikler, kanalizasyon sistemlerine ve atık işleme tesislerine, buradan da çevresel sulara karışmaktadır [45]. Atık işleme tesislerinde özellikle polar olan bileşiklerin eliminasyonu ancak %60-90 düzeyine ulaşabilmektedir [46]. Çalışmamızda *D. magna*'da toksik etkilerini araştırdığımız antidepressan fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin çevresel sularda ve bu sularda yaşayan canlı türlerinde varlığı belirlenen önemli bileşiklerden bir tanesidir.

ABD Teksas Eyaleti'nde yer alan Pecan deresinden toplanan balık *Ictalurus punctatus*, *Pomoxis nigromaculatus*, *Lepomis macrochirus* beyin, karaciğer ve kas örneklerinde fluoksetinin 0.11-1.58 ng/g doku; metaboliti norfluoksetinin ise 1.07-10.27 ng/g doku aralığında biriktiği bildirilmiştir [47]. Kanada, Ontario, Grand Nehri boşaltma havzasındaki atık su işleme tesislerinden alınan suda yapılan analizde fluoksetinin 0.091 µg/L, norfluoksetinin ise 0.011 µg/L düzeylerine ulaştığı belirlenmiştir [48]. Bu değerler çalışmamızda temel aldığımız derişimlerdir. Aynı çalışmada tesislerden 10 m aşağıda kafes içerisinde suda bekletilen balık *Pimephales promelas* örneklerinde fluoksetinin birikmediği, biriken norfluoksetin miktarının ise 1.22 µg/kg olduğu saptanmıştır. Kolpin vd., ABD'de 139 farklı dereden toplanan su örneklerinde ortalama 0.012 µg/L fluoksetin bulunduğunu bildirmişlerdir [49]. Norveç Tromso'da yer alan farklı atık su işleme tesislerindeki pompa istasyonlarından alınan su örneklerinde 0.4-2.4 ng/L derişiminde fluoksetin bulunduğu belirlenmiştir [50]. Daha ileri tarihte Tromso'da yer alan farklı su işleme tesislerinde farklı aylarda yapılan su örneklemelerinde fluoksetinin maksimum 18.7 ng/L, norfluoksetinin ise 9.3 ng/L derişime ulaştığı bildirilmiştir [51]. Kanada Montreal atık su işleme tesisi ve çıkışında yer alan St. Lawrence Nehri girişinden toplanan su örneklerinde fluoksetinin 0.42-3.5 ng/L, norfluoksetinin ise 1.2-4.2 ng/L aralığında bulunduğu belirlenmiştir [52].

Fluoksetinin *D. magna*'da biyobirikim potansiyeli de araştırılmıştır. 0.5 ve 5 µg/L nominal derişimlerinde suya uygulanan fluoksetinin başlangıç derişimi, sırasıyla 0.54±0.05 ve 4.42±0.25 µg/L olarak, 48 saat sonunda ise sırasıyla 0.32±0.02 ve 1.54±0.13 µg/L olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda suda gözlenen bu azalma,

ilacın *D. magna*'da birikimine bağlanmıştır. Fluoksetin ilk 6 saat içerisinde *D. magna*'da sırasıyla  $208.71 \pm 11.83$  ve  $307.15 \pm 14.12$   $\mu\text{g/kg}$  derişimlerine ulaşmış, 48 saat sonunda sırasıyla  $147.95 \pm 17.62$  ve  $268.10 \pm 18.57$   $\mu\text{g/kg}$  olarak belirlenmiştir. İnce bir dış iskelet ve geniş bir yüzey alanı/hacim oranına sahip bu türde, fluoksetinin besin akıntısı ile vücuda kolayca girip karapaksın ince duvarından solunum gazı değişimi sırasında kolayca alınabileceği vurgulanmıştır [44]. Fluoksetin diğer sucul organizmalarda da önemli derecede birikim potansiyeline sahiptir. Örneğin, midye *Mytilus galloprovincialis*'de 30-300 ng/L aralığındaki fluoksetin derişimlerinde birikim gerçekleşen organlar sırasıyla sindirim kanalı  $\geq$  solungaçlar > kabuk/gonadlar şeklindedir [53].

<24 saat *C. dubia* ve *D. magna* örneklerinde fluoksetinin 48 saatlik  $\text{LC}_{50}$  değeri, sırasıyla, 234  $\mu\text{g/L}$  ve 820  $\mu\text{g/L}$ 'dir [47]. Fluoksetin derişimine ve besin bulunurluğuna bağlı olarak *D. magna*'da yavru üretim sayısı üzerine farklı etkiler yapmaktadır.

102 ve 241  $\mu\text{g/L}$  fluoksetinin 7 gün etkisi sonunda *D. magna*'da büyümenin etkilendiği, 21 günlük süre sonunda toplam bireylerin %40'nın öldüğü ve üremenin %32 azaldığı gösterilmiştir. Sonraki jenerasyonda 31, 102 ve 241  $\mu\text{g/L}$  fluoksetin etkisinde juvenillerde uzunluğun azaldığı ve 102  $\mu\text{g/L}$  fluoksetin etkisinde %70 oranında ölüm meydana geldiği, en düşük derişimde bile üremenin %18 azaldığı belirlenmiştir [54]. 100  $\mu\text{g/L}$  fluoksetin etkisinde *D. magna*'da 21 ve 40 gün sonunda toplam yavru sayısının azaldığı belirlenmiştir [55].  $1.6 \times 10^5$ ,  $3.3 \times 10^5$  ve  $6 \times 10^5$  *Chlorella vulgaris* hücresi/mL besin bulunan ortamlarda 40  $\mu\text{g/L}$  fluoksetinin *D. magna*'da yalnızca düşük besin derişimlerinde yavru üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir [56]. Benzer şekilde 36  $\mu\text{g/L}$  fluoksetin, 6 gün etki süresi sonunda ergin ya da juvenillerde hayatta kalma oranı, morfoloji, dayanıklı yumurta üretimi, yavru oluşturma ve cinsiyet oranı üzerine etki etmezken, 30 günlük etkide yavru üretiminde artış meydana gelmiştir [3]. 10  $\mu\text{g/L}$  fluoksetinin 10 gün etkisinde artan yavru üretimine karşılık karbohidrat miktarının istatistiksel önemde olmasa da azaldığı ve oksijen tüketim oranının istatistiksel önemde artış gösterdiği belirlenmiştir [57]. Fluoksetinin serotonin aktivitesini kesintiye uğratması nedeniyle karbohidrat ve oksidatif metabolizmada düzensizliğe yol açtığı ve bu nedenle bu canlıların özellikle

anoksik koşullara dirençsiz hale geldiği belirtilmiştir. *D. magna*'da 80 µg/L fluoksetin etkisinde artan yavru üretiminin 10 ve 50 µg/L serotonin almaç antagonisti siproheptadinin birlikte etkisinde kontrol düzeylerinde azaldığı belirlenmiştir [58]. Bu sonuca göre fluoksetin postsinaptik alanda serotonin aktivitesini artırarak yavru üretiminde artışa neden olmaktadır.

Fluoksetin, *D. magna*'da genellikle karapaks uzunluğu ile ölçülen vücut büyüklüğünün azalmasına yol açmaktadır. 3 ve 10 µg/L gibi nispeten düşük fluoksetin derişimleri *D. magna*'nın 3. döl juvenil yavrularında karapaks uzunluğuna etki etmezken, 30, 100 ve 300 µg/L daha yüksek derişimlerinde, derişime bağlı azalma belirlenmiştir [54]. 40 µg/L fluoksetin düşük besin koşullarında, *D. magna*'da <24 saat juvenillerde vücut büyüklüğünün azalmasına neden olmuştur [58].

Kolinesterazlar, çevresel toksikoloji çalışmaları için yaygın kullanılan biyomarkırlar arasındadır [28]. Fluoksetin etkisinde ChE aktivitesinin araştırıldığı çalışmalar farklı bulgular ortaya koymaktadır. Bu çalışmaların bir kısmında fluoksetinin inhibitör özelliği ortaya konulmuştur. 7 gün 0.5 ve 5 µg/L fluoksetin etkisindeki *D. magna*'da AChE aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [44]. Benzer şekilde, düşük fluoksetin derişimlerinin etkisinde deniz tarağı *Venerupis philippinarum*'da solungaç AChE aktivitesi azalırken, yüksek dozlarda enzim aktivitesinde herhangi bir etki saptanmamıştır [59]. 0.03-300 ng/L fluoksetin etkisinde *M. galloprovincialis*'de solungaç dokusunda AChE aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [53]. Bu bulguların aksine, fluoksetinin ChE aktivitesini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. 120 ve 750 µg/L fluoksetin etkisindeki yengeç *Carcinus maenas*'da kas dokusunda ChE aktivitesinde artış meydana gelmiştir [60]. 75 ng/L fluoksetin etkisinde midye *M. galloprovincialis*'de solungaç dokusunda 3 gün etki sonunda AChE aktivitesi artarken, 15 gün etki sonunda aktivite azalmıştır [61].

Oksidatif stres ile ilişkili analizlere konu olan bileşik ve enzimler yine çevresel toksikoloji çalışmalarında kullanılan ve kirletici ya da farklı bir stres kaynağını belirten genel biyomarkırlar içerisinde önemlidir [28]. Fluoksetinin *D. magna*'da pro-oksidatif etkileri hakkında çalışma bulguları sunulmaya başlanmıştır.

Oksidatif strese karşı antioksidant savunmanın ilk basamağını oluşturan SOD enzim aktivitesi 0.5 µg/L fluoksetin etkisindeki *D. magna*'da artarken 5 µg/L etkide azalmıştır. SOD aktivitesindeki artış lipid peroksidasyonu düzeylerinde azalmaya yol açmıştır [44]. 75 ng/L fluoksetinin 15 gün süre ile etkisinde midye *M. galloprovincialis*'de sindirim kanalında lipid peroksidasyonu düzeylerinin, glutatyon S-transferaz (GST) ve CAT antioksidant enzim aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir [61]. 0.03-300 ng/L fluoksetin derişimleri etkisindeki *M. galloprovincialis*'de sindirim kanalı ve solungaç dokularında CAT ve GST enzim aktiviteleri artarken sindirim kanalı dokusunda lipid peroksidasyonu düzeyleri azalmıştır [53].

Yarı şeffaf özelliği nedeniyle *Daphnia spp.* floresan probalar yardımıyla toksisite mekanizmasının aydınlatılmasında kullanışlı türler olmaktadır [62]. JC1 mitokondriyal membran potansiyeli değişimi hakkında bilgi verici floresan problemlardan bir tanesidir. JC1 ile ölçülen mitokondriyal membran potansiyeli (MMP) depolarizasyonu nedeni ile AgNO<sub>3</sub> nanopartiküllerinin <24 saat *D. magna* örneklerinde mitokondriyal hasara yol açtığı belirlenmiştir [63]. *Streptomyces griseus* toksini valinomisin ya da *Bacillus cereus* toksini olan cereulidenin *in vivo* etkisinde *D. magna*'da sindirim kanalı hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelini depolarize ettiği ve bu değişimin olasılıkla apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [62].

Çalışmamızda fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin sitokrom c ve ERK1/2 protein miktarına etkileri araştırılmıştır. Fakat, bu proteinler ile ilgili *Daphnia spp.*'de yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Buna karşın, diğer canlı türlerinde mitokondrilerden sitokrom c salınımını ve böylece apoptoz mekanizmasını etkilediği yönünde bulgular vardır.

5 mg/kg fluoksetinin 21 gün etkisi sonunda erkek Wistar sıçan karaciğerinde antioksidant enzimler SOD aktivitesinin azaldığı, GPx aktivitesinin ve apoptotik belirteçler olan Bax/Bcl-2 protein oranının arttığı belirlenmiştir [64]. Sonuçlar, fluoksetinin oksidatif stres oluşturma potansiyelinin apoptotik sinyallere neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Fluoksetin sıçan hippocampal piramidal hücrelerinde ve feositokroma (PC12) hücrelerinde voltaj-bağımlı Ca<sup>2+</sup> kanallarını inhibe etmektedir [65], [66]. Burkitt lenfoma hücrelerinde fluoksetin hücre içi Ca<sup>2+</sup>

derişiminin artışı yoluyla apoptoza yol açmaktadır [67]. Aksine izole sıçan karaciğer mitokondrilerinde 50 µM fluoksetinin Ca<sup>2+</sup>-indüklü MPTP açılmasını ve sitokrom c salınımını engellendiği, voltaj-bağımlı anyon kanalını stabilize ettiği ve staurosporin-indüklü apoptotik hücre ölümüne karşı U-937 hücrelerini koruduğu belirlenmiştir [68].

Daphnia cinsi üyelerinde çevresel kirleticilerin apoptotik etkilerine ilişkin çalışmalar oldukça sınırlıdır. *D. pulex*'de farklı gruplardan çevresel kirleticilerin 4 gün etkisinde kaspaz 3/7 aktivitesindeki değişim araştırılmıştır [69]. Fungusid metam sodyum, herbisidler bromasil, fluroksipir, izopropil-*N*-[*m*-klorofenil] karbamat, monuron, orizalin, prometon, *S*-propil bütiletil tiyokarbamat, trikloroasetik asit, insektisidler nikotin, *O*, *O*-dietiltiyofosfat, *O*-diklorobenzen ile bütillenmiş hidroksianizol ve dietilftalat aktivitede önemli artışlara neden olmuştur. Ağır metal kadmiyum (Cd) ve organoklorlu insektisid klordanın farklı derişimlerinin etkisinde *D. magna* hücrelerinde apoptotik hücre oranının azaldığı, aksine nekrotik hücre oranının derişime ve etki süresine bağlı olarak arttığı belirlenmiştir [70]. C70-gallik asit bileşığının 24 saat etkisinde *D. magna*'da lipid peroksidasyonu düzeyleri ile antioksidant enzimler SOD ve GPx aktivitelerinin arttığı, apoptotik hücre sayısında önemli bir değişim olmadığı bildirilmiştir [71].

**3. MATERYAL ve YÖNTEM****3.1. Materyal**

Çalışmamızda model organizma olarak kullanılan *D. magna* örnekleri Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC, ABD firmasından alınarak laboratuvara getirildi. *D. magna* örnekleri havalandırılmış ve dinlendirilmiş 15 L ASTM sert suyu [72] içeren plastik kaplarda en az 10 jenerasyon sonrasına kadar laboratuvar koşullarına adapte edildi. Kültür ortamını hazırlamada kullanılan suyun iletkenliği 10  $\mu\text{S}$ 'den düşüktür [73]. Kültür suyunun özellikleri; sıcaklık  $21\pm1^\circ\text{C}$ , pH 7.60-8.00, çözülmüş oksijen  $>7$  mg/L, toplam sertlik 130-160 mg/L  $\text{CaCO}_3$ , alkalinite 110-120 mg/L  $\text{CaCO}_3$ 'tür. Laboratuvarda ışık yoğunluğu cool white floresan lamba ile nominal  $10.53 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  olacak şekilde ayarlandı. Laboratuvarda 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodu uygulandı [74]. Besin olarak 150-300  $\mu\text{m}$  alabalık yemi (Çamlı Yem, İzmir), hamur mayası (Dr. Oetker Instant Kuru Maya, İzmir) ve kurutulmuş alfalfa (Naturade Alfalfa, Sepe Natural, İzmir) ile hazırlanan karışım kullanıldı [75]. *D. magna* örnekleri haftada üç kez 1.5 mL besin/1 L su olacak şekilde bu karışım ile beslendi. Stokların kültür ortamı her hafta değiştirildi ve *D. magna* stokları 500 adet birey içerecek şekilde su değişimi sırasında hasat edildi. Model organizma olarak kullanılan *D. magna* örnekleri için döl terimi bir anaçtan farklı zamanda dünyaya gelen bireyleri, jenerasyon terimi ise bir anaçtan doğan ve kendileri de anaç olarak hizmet eden bireyleri tanımlamak amacıyla kullanıldı.

Toksikant olarak fluoksetin hidroklorür (IUPAC adı: *N*-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl) phenoxy] propan-1-amine; CAS No: 54910-89-3; CAS No: 56296-78-7) ve onun metaboliti olan norfluoksetin hidroklorür (IUPAC adı: 3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl) phenoxy] propan-1-amine; CAS No: 83891-03-6) uygulandı.

## 3.1.1. Kimyasal Maddeler

|                                                                              |                                               |               |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------|
| 1. Kalsiyum sülfat dihidrat                                                  | CaSO <sub>4</sub>                             | Sigma-Aldrich |
| 2. Sodyum bikarbonat                                                         | NaHCO <sub>3</sub>                            | Sigma-Aldrich |
| 3. 5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)                                     | DTNB                                          | Sigma         |
| 4. Asetiltiyokolin iyodür                                                    | ATChI                                         | Sigma         |
| 5. Redükte L-glutasyon                                                       | GSH                                           | Sigma-Aldrich |
| 6. İndirgenmiş $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotit fosfat $\beta$ -NADPH |                                               | Sigma         |
| 7. Glutasyon redüktaz                                                        | GR                                            | Sigma         |
| 8. <i>tert</i> -bütil hidroperoksit                                          | <i>t</i> -BHP                                 | Aldrich       |
| 9. Tris baz                                                                  | Tris baz                                      | Sigma         |
| 10. Tris hidroklorür                                                         | Tris HCl                                      | Sigma         |
| 11. di-Sodyum etilendiamin tetraasetik asit                                  | EDTA                                          | Sigma-Aldrich |
| 12. 1,1',3,3'-tetramethoxypropane                                            | TMP                                           | Aldrich       |
| 13. Potasyum klorür                                                          | KCl                                           | Sigma-Aldrich |
| 14. di-Potasyum hidrojen fosfat                                              | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               | Sigma-Aldrich |
| 15. Potasyum dihidrojen fosfat                                               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>               | Sigma         |
| 16. Potasyum dikromat                                                        | K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> | Merck         |
| 17. 2-Tiyobarbitürik asit                                                    | TBA                                           | Sigma-Aldrich |
| 18. Trikloroasetik asit                                                      | TCA                                           | Merck         |
| 19. Folin-Ciocalteu's fenol ayırıcı                                          |                                               | Sigma-Aldrich |
| 20. Sodyum hidroksit                                                         | NaOH                                          | Sigma-Aldrich |
| 21. Sodyum lauril sülfat                                                     | SDS                                           | Sigma         |
| 22. Bakır sülfat                                                             | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O          | Sigma         |
| 23. Etil alkol                                                               |                                               | Sigma-Aldrich |
| 24. Magnezyum sülfat heptahidrat                                             | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O          | Sigma-Aldrich |
| 25. Sığır serum albumini                                                     | BSA                                           | Sigma         |
| 26. Sodyum klorür                                                            | NaCl                                          | Sigma-Aldrich |
| 27. Metanol                                                                  |                                               | Sigma-Aldrich |
| 28. Fluoksetin                                                               |                                               | Sigma-Aldrich |
| 29. Norfluoksetin                                                            |                                               | Sigma-Aldrich |

- |                                                                             |               |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 30. 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-imidacarbocyanine iodide JC1 | Sigma-Aldrich |
| 31. Protein markırı                                                         | Bio-Rad       |
| 32. Lityum dodesil sülfat tamponu                                           |               |
| 33. Sinyal artırıcı çözelti                                                 | Invitrogen    |
| 34. PVDF membran                                                            | Invitrogen    |
| 35. BCIP/NBT substrat çözeltisi                                             | Thermo-Fisher |
| 36. Fosfat ile tamponlanmış tuz-Tris tamponu                                | PBS-T         |

**3.1.2. Cihazlar ve Diğer Gereçler**

- |                                        |                                  |
|----------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Analitik Terazı                     | A&D HR-250AZ                     |
| 2. Benmari                             | Daihan Wise Bath                 |
| 3. Buz Makinası                        | İzmark                           |
| 4. Homojenizatör                       | Daihan WiseStir Wisd             |
| 5. Oksijenmetre                        | YSI Environmental DO100          |
| 6. Otomatik Pipet Seti                 | Nichiryo Nichipet EX             |
| 7. Otomatik Pipet Seti                 | Axygen AxyPet                    |
| 8. pH Metre                            | YSI Environmental pH100          |
| 9. Soğutmalı Santrifüj                 | Hettich Universal 320R           |
| 10. Spektrofotometrik Analiz Küvetleri | ISOLAB                           |
| 11. Vorteks                            | IKA MS1 Minishaker               |
| 12. UV-Visible Spektrofotometre        | Shimadzu UV1800                  |
| 13. Distile Su Cihazı                  | Elga Ultra Analytic              |
| 14. Distile Su Cihazı                  | Millipore Rios 8                 |
| 15. Mikroplaka Spektrofotometre        | BioTek EON                       |
| 16. Fotoğraf Makinası                  | Canon EOS 1200D                  |
| 17. Mikroplaka<br>Bottom               | Greiner Polystyrene 96 Well Flat |
| 18. Stereo Mikroskop                   | Olympus SZX16                    |
| 19. Binoküler Mikroskop                | Olympus BX53                     |



|                                       |                          |
|---------------------------------------|--------------------------|
| 20. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop | Carl Zeiss LSM800        |
| 21. Dikey Elektroforez Sistemi        | Invitrogen Mini Gel Tank |
| 22. Kuru Jel Transfer Cihazı          | Invitrogen iBlot2        |
| 23. Orbital Çalkalayıcı               | Cleaver Scientific       |

### 3.2. Yöntem

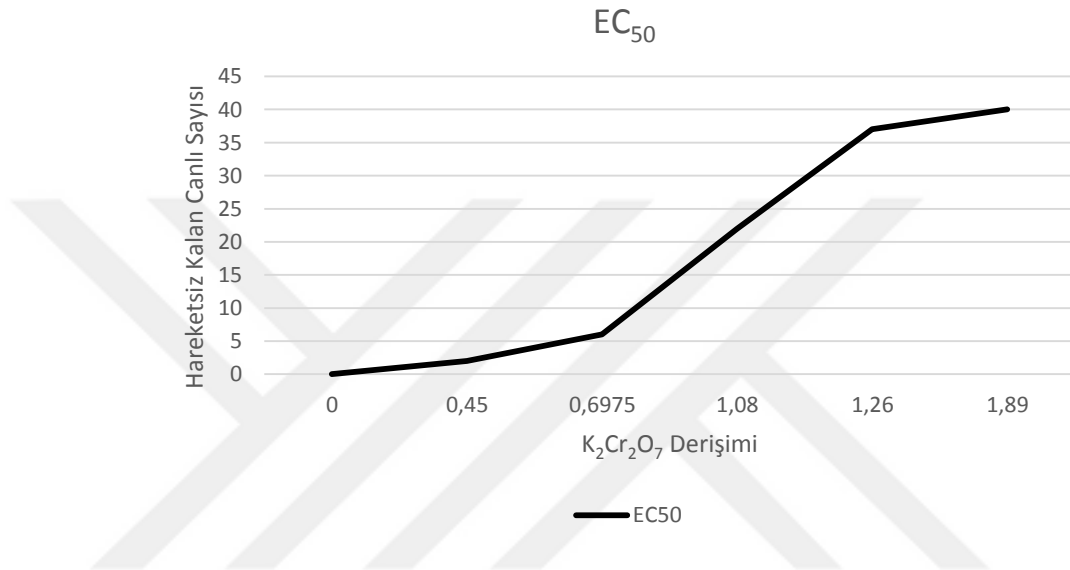
#### 3.2.1. Toksisite Denemeleri

##### 3.2.1.1. Toksisite denemeleri için *D. magna* anaçlarının bakımı

Kullanılan *D. magna* örnekleri arasında genetik varyasyonu minimuma indirebilmek amacıyla, tek bir anaçtan elde edilen en az 5. jenerasyon yavrular anaç olarak kullanıldı. 15 L ASTM sert suyu içeren iki ayrı plastik kaba 250'şer birey içerecek şekilde <24 saatlik yavrular konuldu. İlk su değişimi 7. günde yapıldı ve bu 7 gün içerisinde iki günde bir 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 10. ve 13. günlerde su değişimi yapıldı ve her su değişiminden sonra 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. 8. gün birinci döl yavruları alındı ve bu yavrular balık yemi olarak kullanıldı [73]. Bir anaçtan yaklaşık 48 saatte bir yeni yavrular alındı. 10. gün <24 saatlik ikinci döl yavruları kullanılarak, ana toksisite denemeleri öncesi beş farklı derişimde  $K_2Cr_2O_7$  içeren ASTM sert suyu çözeltileri ile  $EC_{50}$  duyarlılık testi yapıldı. 12. gün <24 saatlik üçüncü döl yavruları ile kronik toksisite denemelerine başlandı. 15. gün <24 saatlik dördüncü döl yavruları ile yeni anaç grubu oluşturuldu. Anaç olarak ayrılan bu yavruardan benzer şekilde elde edilen yavrular ile tekerrürler ve subakut toksisite testleri yapıldı.

$EC_{50}$  duyarlılık testi için 0.45 mg/L, 0.6975 mg/L, 1.08 mg/L, 1.26 mg/L, 1.89 mg/L  $K_2Cr_2O_7$   $EC_{50}$  derişim aralığı belirlendi. 250 mL'lik cam beherlere 200 mL farklı derişimlerde  $K_2Cr_2O_7$  içeren çözeltiler dolduruldu ve her behere 20 adet <24 saatlik *D. magna* yavruları konuldu. Bir behere yalnızca ASTM sert suyu konuldu ve bu kontrol grubu olarak değerlendirildi. 48 saatlik hareketsiz kalma oranları ölçüldü. Hafif dokunmaya tepki vermememe durumu hareketsizlik şeklinde

değerlendirildi. Elde edilen hareketsiz kalma oranlarından yola çıkarak SPSS 17.0 paket programında yer alan Probit analizi testi kullanılarak 24 saatlik  $EC_{50}$  değeri hesaplandı. Buna göre  $EC_{50}$  0.972 mg/L (%95 güven aralığı 0.904-1.042, Şekil 3.1)'dir. Bu sonuç OECD [73] tarafından belirlenen derişim aralığı (0.6-2.1 mg/L) ile uyumludur.



Şekil 3.1 *Daphnia magna* örneklerinin ileri analizler için uygun olup olmadığını anlamak üzere yapılan  $EC_{50}$  duyarlılık testinin grafiği

### 3.2.1.2. Kronik Toksisite Denemeleri

Kronik toksisite denemeleri, stok ve anaç grupları ile aynı laboratuvar koşullarında ve nominal derişimler ile gerçekleştirilmiştir. Deneme süresi sonunda hiçbir grupta ölüm gözlenmedi. Deney kurgusu aşağıdaki şekildedir:

- Kontrol grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri ASTM sert suyu içerisinde 21 gün süreyle tutuldu.
- Fluoksetin grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri fluoksetinin 0.091  $\mu\text{g/L}$  çevresel derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.
- Norfluoksetin grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri norfluoksetinin 0.011  $\mu\text{g/L}$  çevresel derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.

- Fluoksetin ve Norfluoksetin karışım grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri fluoksetinin 0.091 µg/L ile norfluoksetinin 0.011 µg/L çevresel derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.
- 10XFluoksetin grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri fluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı olan 0.91 µg/L derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.
- 10XNorfluoksetin grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri norfluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı olan 0.11 µg/L derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.
- 10XFluoksetin ve 10XNorfluoksetin karışım grubu: Bu gruptaki <24 saatlik *D. magna* örnekleri fluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı olan 0.91 µg/L ile norfluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı olan 0.11 µg/L derişiminin etkisinde 21 gün süreyle tutuldu.

Her gruptaki her tekrar 800 mL ASTM sert suyu içeren cam beherlerde hazırlandı. Her beher 21 adet <24 saat 3. döl *D. magna* örnekleri içermekteydi. Deneme grupları hazırlandıktan sonra içerisine 1.5 mL/L besin verildi. Üzerleri cam kapakla kapatıldı. Deneme gruplarında deneme süresi boyunca 3 gün arayla su değişimi yapıldı. Her su değişiminden sonra 1.5 mL/L besin verildi. Su değişimi sırasında örnekler sayılarak yeni sularına aktarıldı. Su değişiminden önce ASTM sert suyunun pH'ı 8.00 olacak şekilde ayarlandı, çözünmüş oksijen  $9.05 \pm 0.18$ , sıcaklık  $20.20 \pm 0.35^\circ\text{C}$ , alkalinite  $120.42 \pm 7.77$  ve sertlik  $138.51 \pm 8.52$  şeklinde ölçüldü. Her su değişiminden sonra üç günlük kontrol grubu sularında, pH  $7.99 \pm 0.4$ , çözünmüş oksijen  $7.07 \pm 0.86$  ve sıcaklık  $20.20 \pm 0.53^\circ\text{C}$  şeklinde ölçüldü. Deneme süresince 8. günden itibaren her 24 saatte bir her gruptan aynı saatte yavrular toplanıp sayıldı. Tüm yavrular, morfometrik analizler için Falcon tüplerinde %50'lik etil alkol içerisine alındı ve  $+4^\circ\text{C}$  de saklandı. 21. gün sonunda her beherden artık anaç haline gelmiş birer örnek JC1 boyaması için mikropilaka kuyucuklarına alındı ve  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Her beherde geriye kalan 20 adet örnek, suyun uzaklaştırılması için filtreden süzüldü ve filtrenin alt tarafından bir peçete yardımıyla hafif bir şekilde dokunarak kurutuldu. Her beherden 20 adet örnek, daha önceden tartımı yapılan ve buz içerisinde bekletilen bir mikrosantrifüj tüpü içerisine zarar vermeden aktarıldı.

Örneklerin bulunduğu mikrosantrifüj tüpleri tekrar tartılarak canlıların ağırlığı hesaplandı ve analizlere kadar -80°C’de bekletildi. Çalışma iki tekerrürlü yapıldı ve her deneme grubu her tekerrürde dört kez tekrar edildi. Böylece toplamda her deneme grubu için 8 tekrar yapıldı.

### **3.2.1.3. Subakut Toksisite Denemeleri**

Subakut toksisite denemeleri, anaç ve stok kapları ile aynı laboratuvar koşullarında ve nominal derişimler ile gerçekleştirilmiştir. Hem subakut hem de kronik toksisite testlerinde ergin bireyler, biyokimyasal analizler için yeterli protein derişimine ulaşabilmek amacıyla kullanıldı [76]. Deneme süresi sonunda hiçbir grupta ölüm gözlenmedi. Deney kurgusu aşağıdaki şekildedir:

- Kontrol grubu: Bu gruptaki 17 günlük *D. magna* örnekleri ASTM sert suyu içerisinde 4 gün süreyle tutuldu.
- 100XFluoksetin grubu: Bu gruptaki 17 günlük *D. magna* örnekleri fluoksetinin çevresel derişiminin 100 katı olan 9.1 µg/L derişiminin etkisinde 4 gün süreyle tutuldu.
- 100XNorfluoksetin grubu: Bu gruptaki 17 günlük *D. magna* örnekleri norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katı olan 1.1 µg/L derişiminin etkisinde 4 gün süreyle tutuldu.
- 100XFluoksetin ve 100XNorfluoksetin karışım grubu: Bu gruptaki 17 günlük *D. magna* örnekleri fluoksetinin çevresel derişiminin 100 katı olan 9.1 µg/L ile norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katı olan 1.1 µg/L derişiminin etkisinde 4 gün süreyle tutuldu.

Subakut toksisite denemeleri için her biri 15 L ASTM sert suyu içeren iki ayrı plastik kaba 250 adet birey içerecek şekilde kronik toksisite çalışmalarında anaç olarak ayrılan <24 saatlik 4. döl yavruları konuldu. Birinci su değişimi 7. gün, ikinci su değişimi 10. gün yapıldı. Bu canlılardan 8. gün toplanan ilk döl yavruları balık yemi olarak kullanıldı. Yine bu canlıların 10. günde toplanan <24 saat ikinci döl yavruları, diğer tekerrür için 15 L’lik ASTM sert suyu içerisine ayrıldı. 17. günde 800 mL ASTM sert suyu içerisine 21 örnek olacak şekilde rastgele dağıtım yapıldı.

Deneme grupları oluşturulurken bir gün önceden hazırlanıp havalandırılan ASTM sert suyunda pH 8.00'a ayarlandı ve bu suda sıcaklık  $20.00 \pm 0.19^\circ\text{C}$ , alkalinite  $120.02 \pm 4.97$ , sertlik  $145.95 \pm 8.99$  ile çözünmüş oksijen  $9.03 \pm 0.09$  olarak ölçüldü. Deneme grupları hazırlandıktan sonra içerisine 1.5 mL/L olacak şekilde besin verildi. Üzerleri cam kapakla kapatıldı. 48 saat sonunda su değişimi yapıldı. Su değişiminden sonra besin verilmedi. 96 saat sonunda her beherden birer adet örnek JC1 boyaması için mikropilaya kuyucuklarına konuldu. Geriye kalan 20 adet örnek bir filtre yardımıyla suyundan süzüldü ve filtrenin alt tarafından bir peçete yardımıyla hafif bir şekilde dokunarak kurulandı. Her beherdeki 20 örnek, daha önceden tartılıp buzda bekletilen bir mikrosantrifüj tüpü içerisine zarar görmeden aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpleri daha sonra tekrar tartıldı ve canlı ağırlığı hesaplandı. Örnekler analizlere kadar  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Subakut toksisite denemeleri de iki tekerrürlü yapıldı ve 1. tekerrürde her grup dört kez, 2. tekerrürde her grup 5 kez tekrar edildi. Böylece toplamda her deneme grubu için 9 tekrar yapıldı.

### **3.2.2. Biyokimyasal Analizler**

Biyokimyasal analizlere başlamadan önce, her beherdeki 20 *D. magna* örneği havuzlandı ve ağırlığının 4 katı olacak şekilde (w/v) 100 mM KCl, 1 mM EDTA içeren pH 7.4 100 mM potasyum fosfat tamponu ile buz içerisinde homojenize edildi. Elde edilen homojenat  $10000 \times g$ 'de  $+4^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika süreyle santrifüjlendi ve elde edilen supernatant GPx, tChE enzim aktiviteleri ile TBARS ve protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı.

#### **3.2.2.1. Glutasyon Peroksidaz Yöntemi**

Glutasyon peroksidaz, GSH'ın  $\text{H}_2\text{O}_2$  ve organik hidroperoksidler ile GSSG'ye yükseltgenmesini kataliz eder. *t*-bütil hidroperoksid bulunan ortamda GPx'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH yardımıyla GSH'a indirgenir. GPx aktivitesi, NADPH'ın  $\text{NADP}^+$ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbans farkının 340 nm dalga boyunda okunması ile ölçülür [77].

**Ayırıcılar**

1. 1 M Tris Tamponu (pH 8.0)
2. 0.1 M GSH
3. 10 U/mL GR
4. 2 mM NADPH
5. 7 mM *t*-bütil hidroperoksid

**Yöntem**

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesini ölçebilmek için ayırıcılar spektrofotometrik ölçüm küvetine aşağıdaki şekilde konuldu (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Glutasyon peroksidaz yöntemi

| Çözeltiler                       | Örnek (µL) |
|----------------------------------|------------|
| Saf su                           | 635        |
| Tris tamponu                     | 100        |
| GSH                              | 25         |
| GR                               | 100        |
| β-NADPH                          | 100        |
| Supernatant                      | 25         |
| 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. |            |
| <i>t</i> -bütil hidroperoksid    | 10         |

Kör için örnek yerine saf su kullanıldı. Oluşan tepkime sonucu absorbands değerlerindeki değişim 340 nm dalga boyunda 0. dakika ve 2. dakikalarda ölçüldü.

**Hesaplama**

$$\text{GPx aktivitesi } (\mu\text{mol/dak/mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{\epsilon \times l \times V_0}$$

$\Delta\text{ABS}$ = Zamana göre absorbands değişimi

t = Zaman (dak.)

V<sub>t</sub> = Toplam hacim

V<sub>ö</sub> = Örnek hacmi

l = Işık yolu uzunluğu

$\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

$$\text{GPx spesifik aktivitesi } (\mu\text{mol/dak/mg protein}) = \frac{\text{GPx aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

### 3.2.2.2. Total Kolinesteraz Yöntemi

Kolinesterazlar, asetilkolin, butirilkolin ve propiyonilkolin gibi bileşiklerin kolin ve içeriğine göre asetat gibi bileşiklere parçalanması tepkimesini katalizlerler. Substrat olarak kullanılan asetiltiyokolin ile tepkimesinden sonra ürün olarak açığa çıkan tiyokolin ile DTNB'nin tepkimesi sonucu sarı renk veren 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit oluşur. Oluşan rengin şiddeti 405 nm'de ölçülür [78].

#### Ayırıcılar

1. 10 mM Sodyum bikarbonat
2. 10 mM DTNB
3. 0.1 M Potasyum fosfat tamponu (pH 7.2)
4. 0.075 M Asetiltiyokoliniyodür

#### Yöntem

Toplam kolinesteraz enzim aktivitesini ölçebilmek için çözeltiler kör ve örnek olmak üzere iki farklı küvete aşağıdaki şekilde konulur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Total kolinesteraz yöntemi

| Çözeltiler                                | Kör | Örnek |
|-------------------------------------------|-----|-------|
| Tepkime Çözeltisi                         | 125 | 125   |
| Asetiltiyokoliniyodür                     | 100 | 100   |
| Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. |     |       |
| Supernatant                               | -   | 100   |
| Potasyum Tamponu                          | 100 | -     |

Oluşan tepkimede açığa çıkan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidin absorbansı 405 nm dalga boyunda 0. dakika ve 5. dakikalarda ölçüldü.

#### Hesaplama

$$\text{tChE aktivitesi}(\mu\text{mol/dak/mL}) = \frac{\Delta\text{ABS}}{t} \times \frac{V_t}{\square \times l \times V_o}$$

$\Delta\text{ABS}$  = Zamana bağlı olarak absorbans değişimi

t = Zaman (dak.)

$V_t$  = Toplam hacim

$V_o$  = Örnek hacmi

$\square$  =  $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

l = Işık yolu uzunluğu

$$\text{tChE spesifik aktivite} (\mu\text{mol/dakika/mg protein}) = \frac{\text{tChE aktivitesi}}{\text{Protein miktarı}}$$

#### 3.2.2.3. TBARS Yöntemi

Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri aerobik koşullarda TBA ile  $100^\circ\text{C}$ 'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleksin absorbansı spektrofotometrede 535 nm'de ölçülür [79].

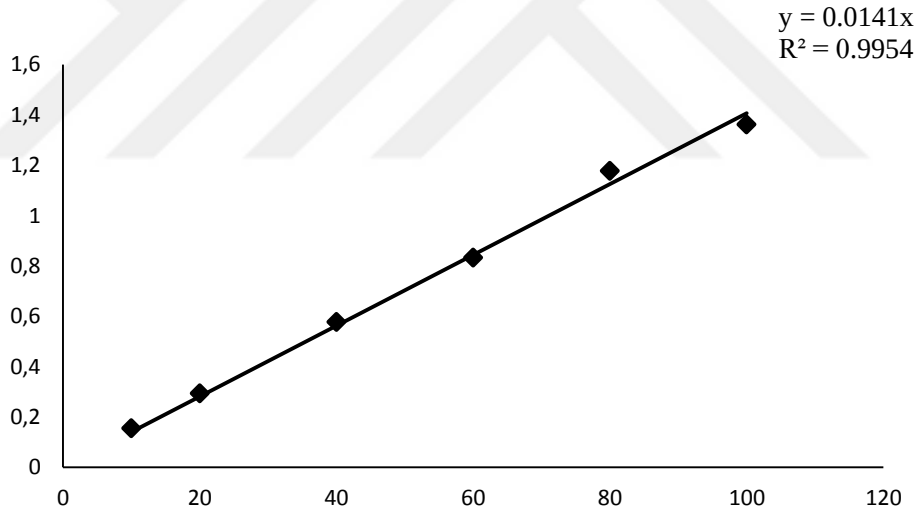


**Ayırıcılar**

1. %0.65 TBA
2. %10 TCA

**Standart Grafiğın Hazırlanması**

400 nmol/mL 1,1',3,3'-tetrametoksipropan stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözelti, 10, 20, 40, 60, 80, 100 nmol/mL olacak şekilde seyreltilti. Standart grafik çiziminde bu çözeltilerin spektrofotometrik analizlerinden elde edilen absorbans değerleri kullanıldı.



Şekil 3.2 TBARS standart grafiğı

**Yöntem**

25 µL supernatanta 25 µL %10'luk TCA eklendi, vortekslendikten sonra 500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. 37.5 µL supernatanta 37.5 µL %0.65'lik TBA eklendi ve vortekslendi. 100°C'lik benmaride 10 dakika bekletildi. Süre sonunda örnekler oda sıcaklığına getirildi ve üzerine 12.5 µL saf su eklendi ve çalkalandı. Bu

tepkime sonunda örneklerin absorbans değeri 535 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri standart grafiğe göre derişim değerlerine dönüştürüldü.

#### **3.2.2.4. Protein Yöntemi**

*D. magna* örneklerinde protein miktarı GPx, tChE spesifik enzim aktiviteleri ile TBARS miktarını hesaplamak amacıyla çalışıldı. Alkali koşullar altında +2 değerlikli bakır (Cu) peptid bağları ile kompleks kurarken +1 değerlikli Cu haline dönüür. Monovalan Cu iyonu ile tirozin, triptofan ve sisteinin radikal gruplarının Folin ayıracı ile tepkimesinde molibden/tungsten mavisine indirgenen kararsız bir bileşik meydana gelir. Oluşan rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda ölçülür [80].

#### **Ayıraçlar**

- a) %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- b) %1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O
- c) %2 Na-K tartarat

Tüm bu çözeltiler karıştırılarak Cu ayıracı hazırlanır.

- 1. %1'lik SDS
- 2. 1 M NaOH
- 3. 2N Folin ayıracı

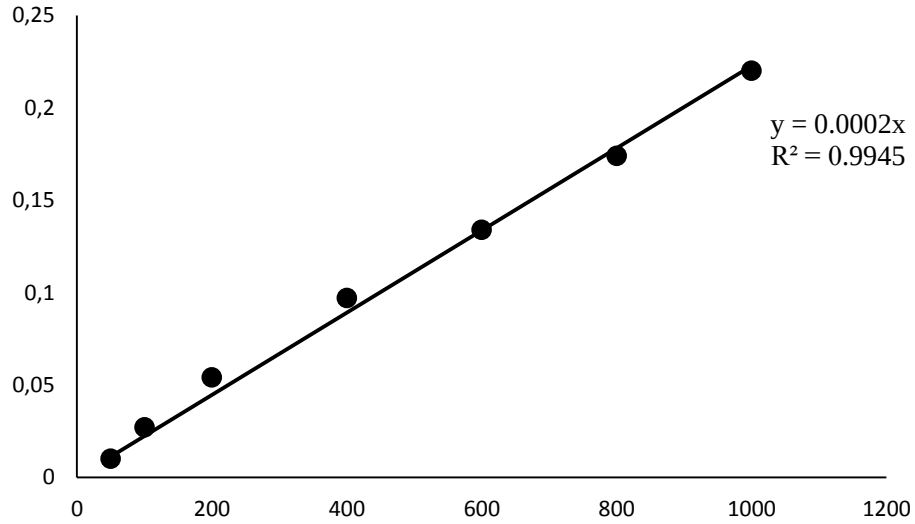
Kullanılacağı zaman eşit hacimde karıştırılır.

- A. Lowry ayıracı (Günlük hazırlanır); 3 mL Cu ayıracı, 1 mL SDS, 1 mL NaOH karıştırılır.
- B. Folin-Ciocalteu's ayıracı: 100 µL Folin-Ciocalteu's 900 µL saf su ile karıştırılır.

#### **Standart Grafiğin Hazırlanması**

Sığır serum albümini kullanılarak 1000 µg/mL stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan bu stok çözelti 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 µg/mL olacak şekilde

seyreltildi. Bu çözeltilerin analizinden sonra ölçülen absorbans değerleri standart grafik çiziminde kullanıldı.



Şekil 3.3 Protein standart grafiği

#### Yöntem

10 µL supernatant üzerine 45 µL Lowry ayıracı eklendi, vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Süre sonunda örnekler 45 µL Folin-Ciocalteu's ayıracı eklendi, vortekslendi ve 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. 750 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değeri ölçüldü. Aynı işlem örnek yerine 10 µL saf su kullanılarak kör için uygulandı. Elde edilen absorbans değerleri standart grafiğe göre derişim değerlerine dönüştürüldü.

#### 3.2.2.5. Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ( $\Delta\Psi_m$ ) Ölçülmesi

Sağlıklı mitokondriler yüksek elektrokimyasal potansiyele sahiptirler. JC1 boyası membrandan geçerek fluoresans yapan kırmızı agregatlar oluşturur. Düşük elektrokimyasal potansiyele sahip mitokondrilerde boyanın birikimi engellenir ve boya yeşil fluoresans yapan monomerler halinde kalır. Daha önceden JC1 boyaması için ayrılan her bir mikrolaka içerisindeki *D. magna* örneği, plaka içerisinde 6 µM

JC-1 boyası ile 90 dak. karanlık ortamda ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda her bir örnek JC1 yıkama çözeltisi ile 2 defa yıkandı. Floresans yapan örnekler Carl Zeiss marka konfokal lazer taramalı mikroskop yardımı ile görüntülendi [62].

### **3.2.2.6.Sitokrom c ve ERK1/2 Protein Derişimlerinin Belirlenmesi**

Dört farklı tekrerrü oluşturan her beherden 20 *D. magna* örneği tek bir tüpte havuzlandı ve toplam 80 örneğin havuzlanması ile elde edilen tek bir tüpteki *D. magna* örneği RIPA lizi tamponu ile parçalandı. Elde edilen çözeltinin öncelikle total protein derişimi modifiye Lowry yöntemi [80] ile belirlendi. Örnekler, 3:1 v/v oranında 4X lityum dodesil sülfat (LDS) tamponu ile karıştırıldı ve 100°C’de 10 dak. boyunca bekletilerek proteinleri denatüre edildi. 100 µg protein içerecek şekilde örnekler, 500 mL yürütme tamponu içeren dikey elektroforez sistemine yerleştirilen %10’luk akrilamid jelindeki kuyucuklara yüklendi. Jelin bir kuyucuğuna 5 µL markır yüklemesi yapıldı. Yükleme devamında proteinler elektroforez tankındaki jelde 80 volt altında yaklaşık bir saat yürütüldü. Tamamı eksi yükle yüklenmiş olan proteinler, moleköl büyüklüklerine göre ayrıldı. Jel elektroforezinde yürütülen proteinler, aktarım cihazı yardımıyla PVDF membrana 10 dak. sürede aktarıldı. Membran ve antikor kullanılarak proteinin tanımlanması işlemine geçildi. Protein bantlarının daha net ve belirgin görünmesi için membran, sinyal artırıcı çözelti içeren kaba yerleştirildi ve 15 dak. süre ile orbital karıştırıcı yardımıyla oda sıcaklığında çalkalandı. Süre sonunda membran, üç kez saf su ile yıkandı. Non-spesifik bağlanmaları en aza indirmek için membran, %5 BSA çözeltisinde 1 saat bekletilerek doyurma işlemi yapıldı. Proteinlerin tanımlanması için her bir birincil antikor (sitokrom c ve ERK1/2) protokolüne göre %5’lik BSA çözeltisi ile 1/1000 oranında seyreltildi. Membran, birincil antikor çözeltisi ile +4°C’de bir gece orbital çalkayıcı yardımı ile soğuk odada inkübe edildi. Daha sonra membranlar, ikincil antikorların uygulanması için PBS-T çözeltisi ile 5’er dak. süreyle üç kez yıkandı. İkincil antikorlar (anti-rabbit) protokolüne göre %5 BSA çözeltisinde 1/6000 oranında seyreltildi. Membranlar, bu çözelti ile oda sıcaklığında 1 saat orbital çalkayıcı

yardımıyla inkübe edildi. Daha sonra, 5'er dak. olmak üzere üç kez PBS-T tamponu ile yıkandı. Membranlar BCIP/NBT çözeltisi ile karıştırıldı. Görüntü oluşunca membranlar saf su ile yıkandı ve fotoğraf makinesi ile görüntüleme yapıldı. Bant koyuluğu ImageJ versiyon 1.46r analiz programı ile ölçülerek kontrole göre yüzde değişim grafikleri hazırlandı (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.2.2.7.Morfometrik Analizler**

%50 etil alkol içerisinde bekletilen örnekler, çukur lam içerisine damlatılan laktik asit üzerine konuldu. Olympus BX53 binoküler mikroskop altında Canon EOS 1200D fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı ve fotoğraflar kaydedildi. Fotoğraflanan örneklerin Micam v2.0 ([http://www.science4all.nl/?Microscopy\\_and\\_Photography](http://www.science4all.nl/?Microscopy_and_Photography)) bilgisayar yazılımı yardımıyla karapaks uzunluğu ölçümü yapıldı. Karapaks uzunluğu başın anterior ucundan kaudal spinanın temeline kadar ölçüldü ve kaudal spina uzunluğu bu ölçüme dahil edilmedi [81]. Kaudal spina gövde temelinden uca olan uzunluk şeklinde ölçüldü. Maksimum karapaks genişliği, karapaksın lateralden en geniş bölgesi dikkate alınarak iki uçtan yatay düzlemde ölçüldü.

### **3.2.3. İstatistiksel Analizler**

Biyokimyasal ve morfometrik analizlerin yanında yavru sayılarının istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 17.0 paket istatistik programında (SPSS Inc. Released 2008. SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.) yapıldı. Verilerin normalitesi Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılım gösteren veriler tek yönlü varyans analizi (OneWay ANOVA) testine tabi tutuldu. Bu test ile gruplar arasında fark görülmüşse öncelikle veri setlerinin Levene testi ile homojenitesi araştırıldı. Homojenlik gösteren veri setleri için gruplar arasındaki istatistiksel ayrım Duncan *post-hoc* testi ile, homojenlik göstermeyen veri setleri için gruplar arasındaki ayrım Tamhane's T2 *post-hoc* testi ile analiz edildi. Normal dağılım göstermeyen veri setleri arasındaki istatistiksel önem derecesi öncelikle Kruskal-Wallis testi uygulanarak belirlendi. Kruskal-Wallis testinde önem

gösteren parametrelerde sürekli bir değişken yönünden bağımsız iki grup arasında fark olup olmadığını test etmek için Mann-Whitney *U* Testi uygulandı [82]. Veriler aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde sunuldu ( $P<0.05$ ).



#### **4. BULGULAR ve TARTIŞMA**

##### **4.1. Bulgular**

Bu çalışmada fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin ve çevresel derişimlerinin 10 katının kronik ve çevresel derişimlerinin 100 katının subakut ayrı ve karışım halinde etkilerinin *D. magna*'da GPx ve tChE enzim aktivitelerine, lipid peroksidasyonu düzeylerine, total protein miktarlarına, mitokondriyal membran potansiyeline, sitokrom c ile ERK1/2 protein derişimlerine ve morfometrik özellikleri ile yavru üretme oranına etkisi araştırılmıştır.

##### **4.1.1. Fluoksetin ve Metaboliti Norfluoksetinin Kronik Etkisinde *D. magna*'da Ölçülen Değişimler**

##### **4.1.1.1. Biyokimyasal Değişimler**

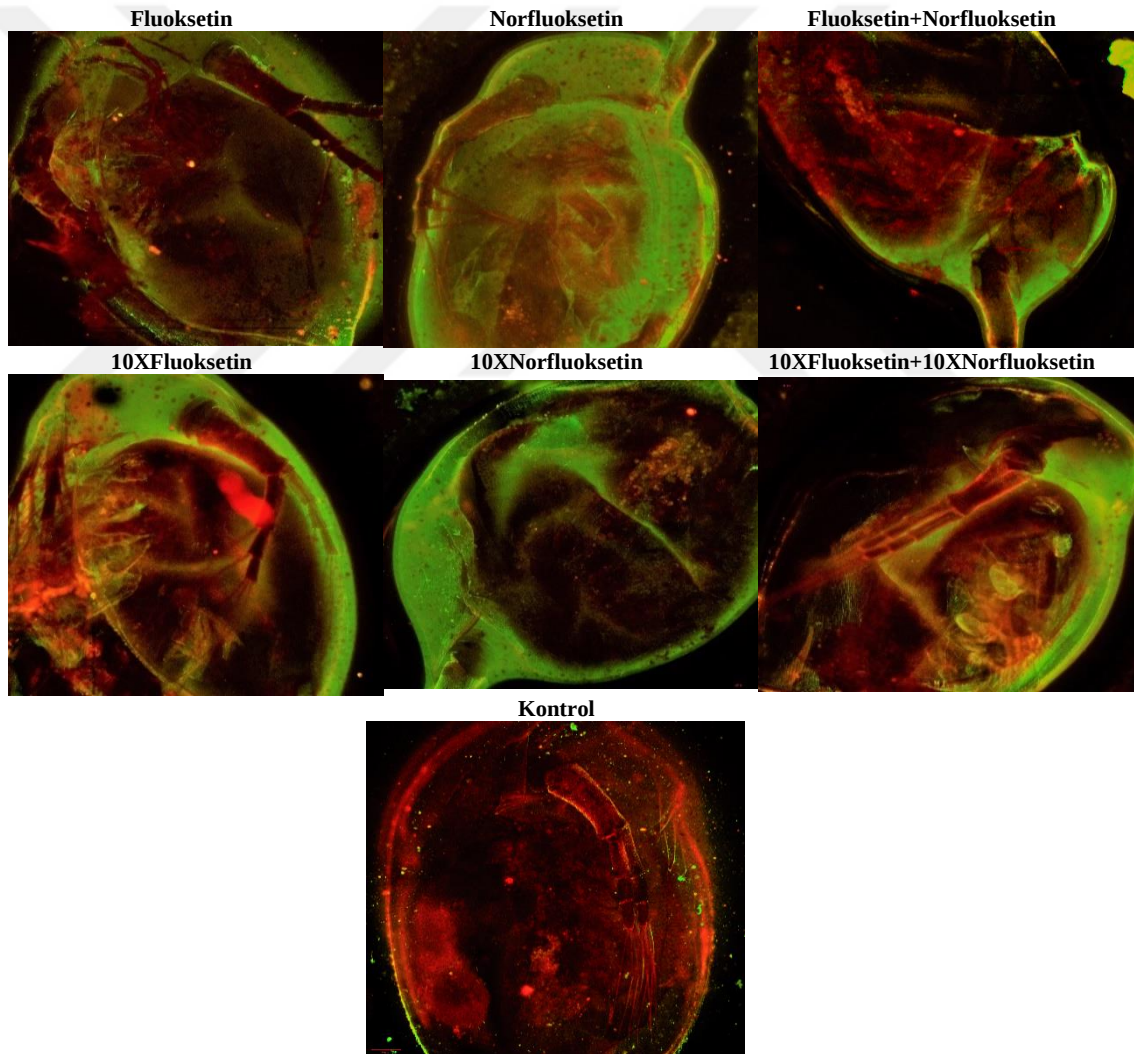
*D. magna*'da fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin ve çevresel derişimlerinin 10 katının ayrı ve karışım halinde kronik etkisinde GPx, tChE enzim aktivitelele, lipid peroksidasyonu düzeylele ile total protein miktarındaki değişimler Çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin ayrı ve karışım halinde 21 günlük kronik etkisi, GPx aktivitesinde herhangi bir değişime neden olmamıştır. Benzer şekilde çevresel derişimlerinin 10 katının karışım halinde uygulanması GPx aktivitesini etkilemezken fluoksetin ve norfluoksetinin 10 katı çevresel derişimlerinin ayrı etkilele aktivitede sırasıyla %82.98 ve %31.92 oranında artışa yol açmıştır. Fluoksetin ve norfluoksetinin çevresel derişimlerinin birlikte ve ayrı etkisi tChE aktivitesinde sırasıyla %40.48, %60.71 ve %54.76 oranında artışa neden olmuştur. Fluoksetinin çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde tChE aktivitesi %61.91 oranında artarken diğer 10 katı derişim uygulanan gruplarda herhangi bir değişim belirlenememiştir. Fluoksetin ve norfluoksetinin ayrı ve karışım halinde çevresel derişimlerinde lipid peroksidasyonu düzeylele değişmezken çevresel

derişimlerinin 10 katı uygulandığı tüm gruplarda düzeyler hem kontrole hem de çevresel derişim uygulanan gruplara oranla artış göstermiştir (kontrole göre sırasıyla fluoksetin için %100.20, norfluoksetin için %167.35 ve karışımları için %90.97). Fluoksetin ve norfluoksetinin çevresel ya da çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da total protein düzeylerinde herhangi bir değışim belirlenememiştir (Çizelge 4.1).

#### 4.1.1.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom c ve ERK1/2 Protein

##### Derişimlerdeki Değışimler



Resim 4.1 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da mitokondriyal membran potansiyeli değışimi analizine ait görüntüler ( — 200 µm).



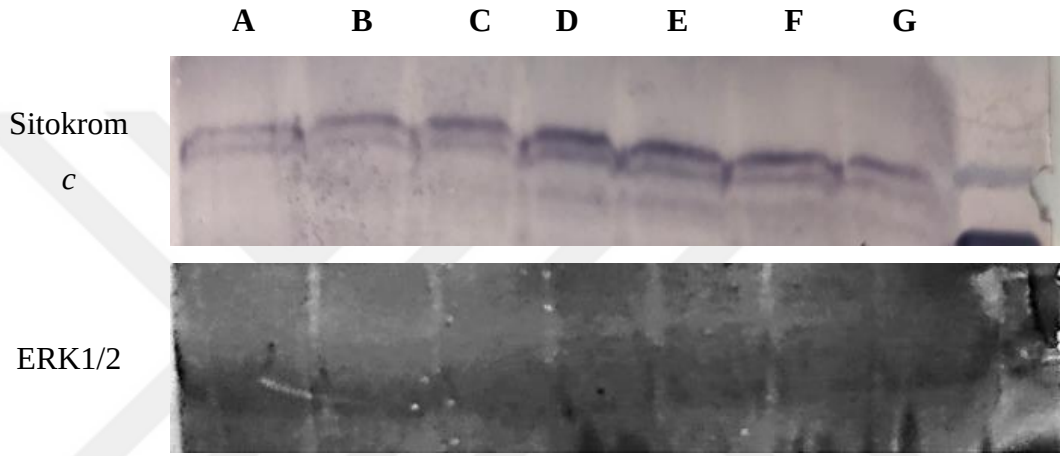
Çizelge 4.1 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*' da GPx ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değışimler

|                                             | GPx<br>( $\mu\text{mol/dak/mg}$<br>protein) | tChE<br>( $\text{nmol/dak/mg}$<br>protein) | TBARS<br>( $\text{nmol/mg protein}$ ) | Total Protein<br>( $\text{mg/mL}$ ) |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                              | 0.047 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>              | 0.0084 $\pm$ 0.0014 <sup>ac</sup>          | 8.169 $\pm$ 2.892 <sup>a</sup>        | 1.143 $\pm$ 0.271 <sup>a</sup>      |
| <b>Fluoksetin</b>                           | 0.048 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>              | 0.0118 $\pm$ 0.0014 <sup>b</sup>           | 8.413 $\pm$ 0.999 <sup>a</sup>        | 0.972 $\pm$ 0.038 <sup>a</sup>      |
| <b>Norfluoksetin</b>                        | 0.051 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>              | 0.0135 $\pm$ 0.0009 <sup>b</sup>           | 11.670 $\pm$ 1.347 <sup>ab</sup>      | 0.996 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>      |
| <b>Fluoksetin + Norfluoksetin</b>           | 0.056 $\pm$ 0.010 <sup>ac</sup>             | 0.0130 $\pm$ 0.0009 <sup>b</sup>           | 8.750 $\pm$ 1.106 <sup>a</sup>        | 0.948 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>      |
| <b>10XFluoksetin</b>                        | 0.086 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>              | 0.0136 $\pm$ 0.0009 <sup>b</sup>           | 16.354 $\pm$ 3.315 <sup>b</sup>       | 0.909 $\pm$ 0.028 <sup>a</sup>      |
| <b>10XNorfluoksetin</b>                     | 0.062 $\pm$ 0.010 <sup>c</sup>              | 0.0098 $\pm$ 0.0007 <sup>a</sup>           | 21.840 $\pm$ 6.003 <sup>c</sup>       | 0.966 $\pm$ 0.125 <sup>a</sup>      |
| <b>10XFluoksetin +<br/>10XNorfluoksetin</b> | 0.050 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>              | 0.0073 $\pm$ 0.0016 <sup>c</sup>           | 15.600 $\pm$ 3.283 <sup>b</sup>       | 1.029 $\pm$ 0.098 <sup>a</sup>      |

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Kontrol grubuna göre farklı harfler ile gösterilen diğer gruplar arasında istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $P<0.05$ ;  $N=4$ ).

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da MMP değışimi analizine ait görüntüler Resim 4.1'de gösterilmiştir.

Mitokondriyal membran potansiyeli kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en çok etkilenenden en aza doğru norfluoksetin, 10X norfluoksetin, 10X fluoksetin, 10X fluoksetin + 10X norfluoksetin, fluoksetin, fluoksetin + norfluoksetin olduğu gözlemlendi (Resim 4.1).

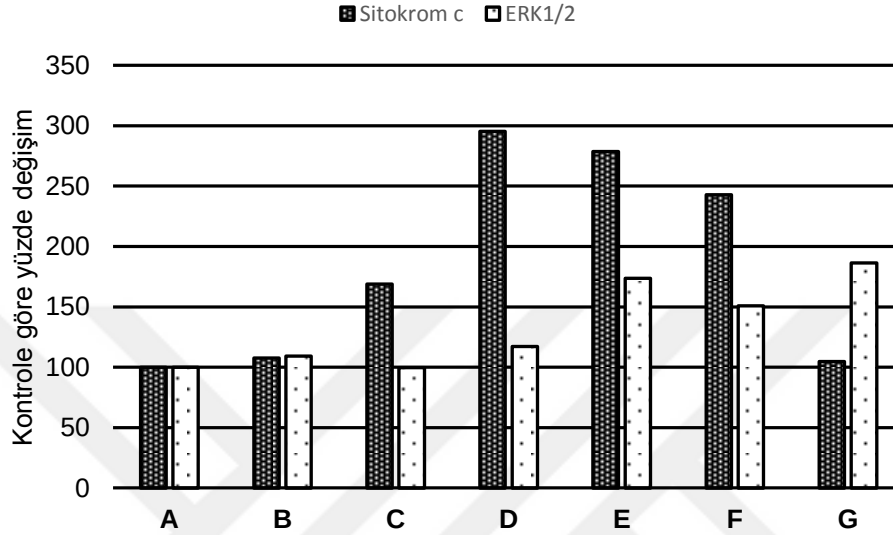


Resim 4.2 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimi analizine ait jel görüntüleri (A: Kontrol; B: Fluoksetin; C: Norfluoksetin; D: Fluoksetin+Norfluoksetin; E: 10XFluoksetin; F: 10XNorfluoksetin; G: 10XFluoksetin+10XNorfluoksetin)

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimlerinin değışimi Resim 4.2 ve Şekil 4.1'de görölmektedir.

Kronik etkide norfluoksetinin her iki derişiminde de sitokrom c derişimi belirgin ölçüde artmıştır. Çevresel derişimlerinde karışım grubunda yine sitokrom c derişimi artarken çevresel derişimin 10 katının uygulandığı grupta sitokrom c düzeyinde herhangi bir değışim meydana gelmemiştir. Fluoksetin çevresel derişiminde sitokrom c derişimini etkilemezken 10 katı uygulandığı grupta sitokrom c derişimini belirgin bir şekilde artırmıştır (Resim 4.2 ve Şekil 4.1).

Çevresel derişimin 10 katının ayrı ve karışım halinde uygulandığı gruplarda ERK1/2 protein derişimi kontrole oranla belirgin bir şekilde artmıştır (Resim 4.2 ve Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna*'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişiminin kontrole göre yüzde derişimi (A: Kontrol; B: Fluoksetin; C: Norfluoksetin; D: Fluoksetin+Norfluoksetin; E: 10XFluoksetin; F: 10XNorfluoksetin; G: 10XFluoksetin+10XNorfluoksetin)

#### 4.1.1.3. Morfometrik Değişimler

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde <24 saat *D. magna* yavrularının karapaks uzunluğu, maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğu ölçümlerine ait veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çevresel derişiminde fluoksetin 2., 3., 4. ve 5. dölde karapaks uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. 4. ve 5. dölde maksimum karapaks genişliğinde ise azalmaya yol açmıştır. 3. dölde kaudal spina uzunluğu çevresel fluoksetin derişiminde azalırken 4. dölde artmıştır. Çevresel derişiminde norfluoksetin 2., 4. ve 5. dölde karapaks uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. Çevresel derişiminde norfluoksetin, yalnızca 4. dölde maksimum karapaks genişliğinde azalmaya yol açmıştır. Kaudal spina uzunluğu 3. ve 4. dölde azalma göstermiştir. Fluoksetin ve

norfluoksetinin çevresel derişimlerinin karışımının etkisinde 3. dölde ölçülen tüm parametreler azalırken 5. dölde karapaks uzunluğu dışındaki tüm parametreler artış göstermiştir. 4. dölde kaudal spina uzunluğu azalmıştır.

Çevresel derişiminin 10 katının etkisinde fluoksetin 3. dölde karapaks uzunluğunda ve maksimum karapaks genişliğinde artışa, 4. ve 5. döllerde ise azalmaya neden olmuştur. Yalnızca 5. dölde kaudal spina uzunluğunda azalma meydana gelmiştir. Çevresel derişiminin 10 katında norfluoksetin, 2. dölde maksimum karapaks genişliğinde artışa, 5. dölde azalmaya neden olmuştur. 3. dölde ve genel ortalama kaudal spina uzunluğunda azalmaya yol açmıştır. 4. ve 5. döllerde karapaks uzunluğunu azaltmıştır. Çevresel derişimlerinin 10 katında fluoksetin ve norfluoksetin etkisindeki *D. magna* anaçlarının 2. ve 3. döl yavrularının karapaks uzunluğunda artış meydana gelmiştir. 2. döl yavrularında maksimum karapaks genişliği de artarken 3. döl yavrularında kaudal spina uzunluğu azalma göstermiştir. Bu bulguların aksine, 4. ve 5. döl yavrularında kaudal spina uzunluğu etkilenmezken karapaks uzunluğu ve maksimum karapaks genişliği azalmıştır.

Tüm döllerde elde edilen yavruların morfometrik analizlerine göre fluoksetin ve norfluoksetin hem çevresel hem de çevresel derişiminin 10 katı düzeylerinde birlikte ya da ayrı uygulamasına bakılmaksızın karapaks ve kaudal spina uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. Maksimum karapaks genişliğinde de norfluoksetinin 10 katı ve 10 katı karışım uygulandığı gruplar dışında tüm gruplar da azalma ölçülmüştür.

#### **4.1.1.4. Yavru Üretme Potansiyeline Etkiler**

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinin, *D. magna*'nın yavru üretme potansiyelinde meydana getirdiği değişime ait veriler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Fluoksetin çevresel derişiminde yalnızca 3. dölde yavru üretim sayısında artışa yol açmıştır. Aksine metaboliti norfluoksetin 2. döl dışında tüm döllerde yavru üretim sayısında artışa yol açmıştır. Tüm döllerde üretilen toplam yavru sayısı bakımından da bu artış istatistiksel anlamlıdır. Fluoksetin ve norfluoksetinin çevresel

derişimlerinde karışım olarak uygulandığı grupta, tüm döllede ve genel yavru üretim sayısı ortalaması açısından kontrole göre oldukça yüksektir. Tüm etki grupları içerisinde en yüksek yavru üretim sayısına, bu karışım grubunun 3. döl üretimi sırasında ulaşılmıştır. Artış kontrole göre %227.25 düzeyindedir; fakat bu değişim fluoksetin grubuna göre de anlamlı olsa da norfluoksetin grubundan farklı değildir.

Çevresel derişiminin 10 katı uygulandığı grupta fluoksetin 1. ve 3. döllede yavru üretim sayısında artışa neden olmakla birlikte, 5. dölde yavru üretim potansiyelini azaltmıştır. Tüm döllede ortalama yavru üretim sayısına ise etki etmemiştir. Çevresel derişiminde gösterdiği etkinin aksine, 10 katı derişiminde norfluoksetin 2. dölde ve genel yavru üretim ortalamasında azalmaya yol açmıştır. Çevresel derişimin 10 katı verildiği karışım grubunda 1., 2. ve 3. döllede yavru üretim sayısı artmış, 5. dölde ise azalmıştır. 10 katı karışım grubunda genel yavru üretim potansiyelinde herhangi bir değişim bulunamamıştır.

#### **4.1.2. Fluoksetin ve Metaboliti Norfluoksetinin Subakut Etkisinde *D. magna*'da Ölçülen Değişimler**

##### **4.1.2.1. Biyokimyasal Değişimler**

*D. magna*'da fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının ayrı ve karışım halinde subakut etkisinde GPx ve tChE enzim aktivitelerindeki, lipid peroksidasyonu düzeylerindeki ve total protein miktarındaki değişimler Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının ayrı ve karışım halinde subakut etkisinde *D. magna*'da GPx aktivitesi tüm etki gruplarında artmıştır. Artış fluoksetin grubunda %177.78, norfluoksetin grubunda %333.33 ve karışım grubunda %104.76 oranındadır. Norfluoksetin grubunda GPx aktivitesindeki artış karışım grubuna göre de istatistiksel fark düzeyindedir. tChE enzim aktivitesi tüm etki gruplarında kontrole oranla artış göstermiştir. Bu artış fluoksetin grubunda %262.50, norfluoksetin grubunda %231.25 ve karışım grubunda %237.50'dir. Lipid peroksidasyonu düzeyleri enzim aktivitelerinde olduğu gibi artış göstermiştir. Bu artış fluoksetin grubunda %539.05, norfluoksetin grubunda %125.95

ve karışım grubunda %232.75'dir. Total protein miktarı ise fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde azalma göstermiştir (Çizelge 4.4). Bu azalma fluoksetin grubunda %46.40, norfluoksetin grubunda %59.18 ve karışım grubunda %56.39'dur.



Çizelge 4.2 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisinde *D. magna* <24 saat yavrularının karapaks, maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğundaki değışimler (µm)

|                         | Karapaks Uzunluğu          | Maks. Karapaks Gen.        | Kaudal Spina Uzunluğu      | Karapaks Uzunluğu           | Maks. Karapaks Gen.         | Kaudal Spina Uzunluğu      | Karapaks Uzunluğu          | Maks. Karapaks Gen.         | Kaudal Spina Uzunluğu      |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                         | 1. Döl                     |                            |                            | 2. Döl                      |                             |                            | 3. Döl                     |                             |                            |
| <b>Kontrol</b>          | 777.63±50.37               | 430.00±40.98               | 403.21±30.43               | 880.89±85.85 <sup>a</sup>   | 473.71±86.94 <sup>acd</sup> | 415.33±31.48               | 847.02±46.14 <sup>a</sup>  | 490.62±52.81 <sup>ad</sup>  | 411.47±42.75 <sup>a</sup>  |
| <b>Fluoksetin</b>       | 773.04±37.27               | 414.47±43.08               | 385.18±26.37               | 827.82±76.06 <sup>b</sup>   | 437.51±62.93 <sup>c</sup>   | 400.55±33.11               | 806.87±45.74 <sup>b</sup>  | 475.63±53.62 <sup>ac</sup>  | 371.21±42.03 <sup>b</sup>  |
| <b>Norfluoksetin</b>    | 748.48±30.42               | 408.46±38.88               | 354.02±34.59               | 842.26±72.46 <sup>b</sup>   | 448.53±66.14 <sup>ac</sup>  | 403.53±28.64               | 838.66±41.81 <sup>a</sup>  | 475.02±38.87 <sup>ac</sup>  | 378.07±44.39 <sup>bc</sup> |
| <b>FLX+NOR</b>          | 774.21±33.85               | 420.94±47.82               | 366.97±29.26               | 857.27±56.06 <sup>a</sup>   | 466.04±55.09 <sup>ad</sup>  | 397.35±32.28               | 812.37±45.20 <sup>b</sup>  | 469.19±45.39 <sup>bc</sup>  | 369.74±39.85 <sup>b</sup>  |
| <b>10XFluoksetin</b>    | 742.59±32.68               | 400.94±45.76               | 345.06±25.88               | 874.13±107.48 <sup>ab</sup> | 496.44±97.67 <sup>de</sup>  | 406.11±42.99               | 906.22±80.93 <sup>c</sup>  | 524.35±70.22 <sup>e</sup>   | 397.25±40.16 <sup>ac</sup> |
| <b>10XNorfluoksetin</b> | 764.20±34.56               | 407.58±36.87               | 358.79±26.18               | 893.78±101.5 <sup>ac</sup>  | 521.56±78.70 <sup>be</sup>  | 401.38±41.71               | 857.86±69.39 <sup>a</sup>  | 492.76±67.99 <sup>abf</sup> | 379.91±41.53 <sup>bc</sup> |
| <b>10FLX+NOR</b>        | 733.73±34.09               | 388.53±43.23               | 349.36±41.89               | 925.61±102.05 <sup>c</sup>  | 544.48±81.90 <sup>b</sup>   | 407.98±53.59               | 915.73±105.30 <sup>c</sup> | 523.95±90.61 <sup>def</sup> | 380.28±56.67 <sup>bc</sup> |
|                         | 4. Döl                     |                            |                            | 5. Döl                      |                             |                            | Genel Ortalama             |                             |                            |
| <b>Kontrol</b>          | 887.59±22.54 <sup>a</sup>  | 483.00±31.22 <sup>a</sup>  | 391.97±31.30 <sup>ae</sup> | 899.73±64.54 <sup>a</sup>   | 497.67±49.17 <sup>a</sup>   | 385.83±30.28 <sup>ac</sup> | 864.98±70.32 <sup>a</sup>  | 478.29±59.63 <sup>a</sup>   | 400.97±35.35 <sup>a</sup>  |
| <b>Fluoksetin</b>       | 842.86±27.41 <sup>bd</sup> | 456.71±33.74 <sup>bc</sup> | 414.14±32.39 <sup>b</sup>  | 783.66±58.17 <sup>b</sup>   | 446.36±35.11 <sup>b</sup>   | 363.03±51.67 <sup>a</sup>  | 805.90±58.45 <sup>b</sup>  | 444.51±50.00 <sup>b</sup>   | 386.75±42.57 <sup>b</sup>  |
| <b>Norfluoksetin</b>    | 852.19±55.07 <sup>bc</sup> | 449.72±52.39 <sup>b</sup>  | 372.00±28.72 <sup>cd</sup> | 890.85±100.06 <sup>c</sup>  | 503.89±71.46 <sup>af</sup>  | 389.79±49.72 <sup>cb</sup> | 831.13±78.71 <sup>c</sup>  | 455.78±62.44 <sup>bd</sup>  | 378.81±41.51 <sup>c</sup>  |
| <b>FLX+NOR</b>          | 878.82±56.81 <sup>a</sup>  | 473.41±60.36 <sup>ac</sup> | 367.68±31.62 <sup>d</sup>  | 891.22±93.96 <sup>ac</sup>  | 532.30±63.71 <sup>c</sup>   | 395.54±35.53 <sup>cb</sup> | 836.74±74.78 <sup>c</sup>  | 468.28±65.78 <sup>cef</sup> | 378.73±36.03 <sup>c</sup>  |
| <b>10XFluoksetin</b>    | 845.27±47.09 <sup>bd</sup> | 454.40±37.51 <sup>b</sup>  | 395.90±28.95 <sup>a</sup>  | 836.93±35.9 <sup>d</sup>    | 462.11±30.48 <sup>ed</sup>  | 393.98±25.68 <sup>b</sup>  | 840.96±86.02 <sup>c</sup>  | 467.55±73.56 <sup>deg</sup> | 387.88±39.61 <sup>bd</sup> |
| <b>10XNorfluoksetin</b> | 855.91±22.15 <sup>c</sup>  | 480.38±24.82 <sup>a</sup>  | 393.96±41.53 <sup>a</sup>  | 838.38±98.52 <sup>e</sup>   | 476.48±69.73 <sup>def</sup> | 386.65±44.56 <sup>ab</sup> | 837.82±84.44 <sup>c</sup>  | 472.15±71.44 <sup>afg</sup> | 382.26±41.47 <sup>cd</sup> |
| <b>10FLX+NOR</b>        | 833.00±42.33 <sup>d</sup>  | 465.94±25.89 <sup>c</sup>  | 381.00±23.75 <sup>ce</sup> | 832.97±88.68 <sup>de</sup>  | 470.24±61.02 <sup>be</sup>  | 381.03±45.28 <sup>ab</sup> | 849.93±105.67 <sup>c</sup> | 480.21±84.12 <sup>afg</sup> | 381.02±48.93 <sup>cd</sup> |

Veriler aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında istatistik ayrım bulunmaktadır ( $P<0.05$ ,  $N=9-27$ , Genel Ortalama analizi için  $N=227-267$ )

Çizelge 4.3 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel ve çevresel derişiminin 10 katının kronik etkisindeki *D. magna*'nın yavru üretme potansiyelinde meydana gelen değışimler

|                                        | 1. döl                     | 2. döl                     | 3. döl                    | 4. döl                     | 5. döl                    | Genel Ortalama            |
|----------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Kontrol</b>                         | 76.83±13.62 <sup>a</sup>   | 50.08±16.49 <sup>ac</sup>  | 44.08±16.39 <sup>a</sup>  | 73.91±15.31 <sup>a</sup>   | 84.75±32.33 <sup>ac</sup> | 65.93±25.12 <sup>a</sup>  |
| <b>Fluoksetin</b>                      | 79.75±24.41 <sup>ac</sup>  | 46.17±5.67 <sup>a</sup>    | 62.67±18.13 <sup>b</sup>  | 78.67±32.06 <sup>a</sup>   | 81.33±29.68 <sup>a</sup>  | 69.72±26.86 <sup>a</sup>  |
| <b>Norfluoksetin</b>                   | 143.33±44.65 <sup>b</sup>  | 69.50±25.43 <sup>cdf</sup> | 140.67±51.79 <sup>c</sup> | 135.58±64.15 <sup>bc</sup> | 62.17±22.82 <sup>cd</sup> | 110.25±56.62 <sup>b</sup> |
| <b>Fluoksetin + Norfluoksetin</b>      | 126.33±29.87 <sup>b</sup>  | 94.25±43.39 <sup>bd</sup>  | 144.25±29.46 <sup>c</sup> | 135.33±68.12 <sup>b</sup>  | 45.42±9.29 <sup>b</sup>   | 109.12±53.68 <sup>b</sup> |
| <b>10XFluoksetin</b>                   | 129.50±59.01 <sup>bd</sup> | 53.50±29.18 <sup>aeg</sup> | 60.58±9.25 <sup>b</sup>   | 84.92±58.56 <sup>ac</sup>  | 41.83±17.39 <sup>bd</sup> | 74.07±47.97 <sup>ac</sup> |
| <b>10XNorfluoksetin</b>                | 70.58±21.94 <sup>a</sup>   | 42.25±26.79 <sup>e</sup>   | 57.67±29.90 <sup>ab</sup> | 52.67±33.18 <sup>a</sup>   | 67.58±27.57 <sup>c</sup>  | 58.15±29.06 <sup>c</sup>  |
| <b>10XFluoksetin+10X Norfluoksetin</b> | 98.58±31.79 <sup>cd</sup>  | 64.42±19.98 <sup>fg</sup>  | 56.75±8.86 <sup>b</sup>   | 60.58±48.52 <sup>a</sup>   | 42.25±15.52 <sup>b</sup>  | 64.52±33.37 <sup>ac</sup> |

Veriler aritmetik ortalama±standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen veriler arasında istatistik ayırım bulunmaktadır ( $P<0.05$ ).



Çizelge 4.4 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da GPx ve tChE enzim aktiviteleri ile lipid peroksidasyonu ve total protein düzeylerinde meydana gelen değışimler

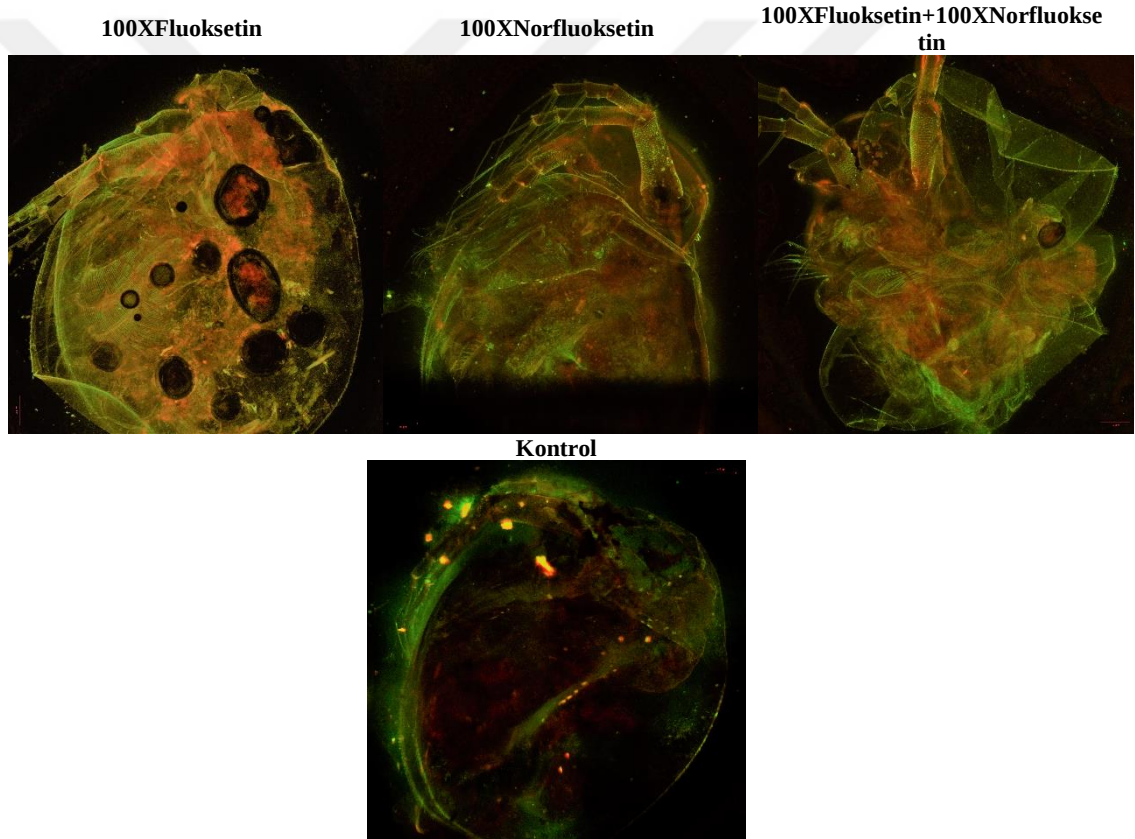
|                                           | GPx<br>( $\mu\text{mol/dak/mg}$<br>protein) | tChE<br>( $\mu\text{mol/dak/mg}$<br>protein) | TBARS<br>(nmol/mg protein)        | Total Protein<br>(mg/mL)       |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Kontrol</b>                            | 0.063 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>              | 0.016 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>               | 10.635 $\pm$ 3.731 <sup>a</sup>   | 0.681 $\pm$ 0.107 <sup>a</sup> |
| <b>100XFluoksetin</b>                     | 0.175 $\pm$ 0.071 <sup>bc</sup>             | 0.058 $\pm$ 0.020 <sup>b</sup>               | 67.963 $\pm$ 32.735 <sup>b</sup>  | 0.365 $\pm$ 0.048 <sup>b</sup> |
| <b>100XNorfluoksetin</b>                  | 0.273 $\pm$ 0.221 <sup>b</sup>              | 0.053 $\pm$ 0.009 <sup>b</sup>               | 24.030 $\pm$ 7.179 <sup>c</sup>   | 0.278 $\pm$ 0.071 <sup>b</sup> |
| <b>100XFluoksetin + 100XNorfluoksetin</b> | 0.129 $\pm$ 0.042 <sup>c</sup>              | 0.054 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>               | 35.388 $\pm$ 15.764 <sup>bc</sup> | 0.297 $\pm$ 0.069 <sup>b</sup> |

Veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde sunulmuştur. Farklı harfler ile gösterilen gruplar arasında istatistiksel ayırım bulunmaktadır ( $P<0.05$ ;  $N=5$ ).

#### 4.1.2.2. Mitokondriyal Membran Potansiyeli ile Sitokrom c ve ERK1/2 Protein Derişimlerindeki Değişimler

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimler Resim 4.3'de gösterilmiştir.

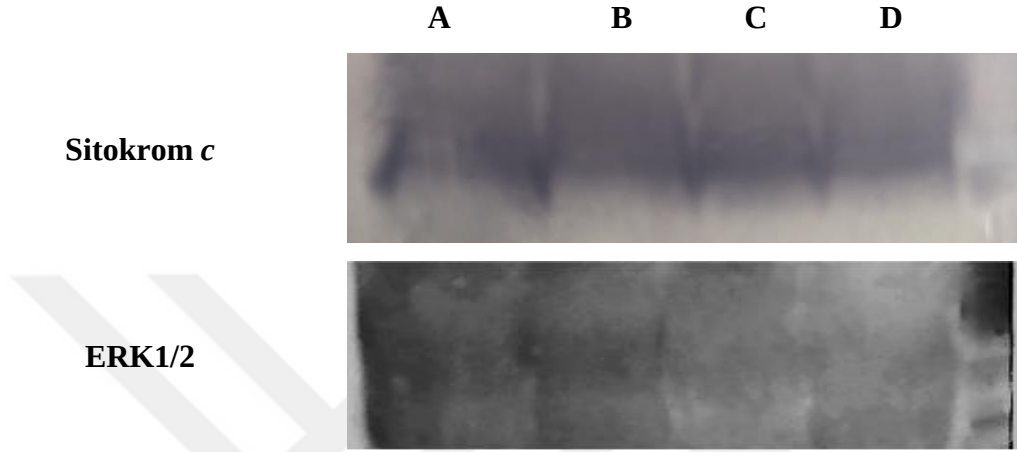
Resim 4.3'de kırmızı alanlardan anlaşılacağı üzere kontrol dahil tüm gruplarda mitokondriyal membran depolarizasyonu gerçekleşmesine karşın, değişim kontrol grubuna göre etki gruplarında daha belirgindir.



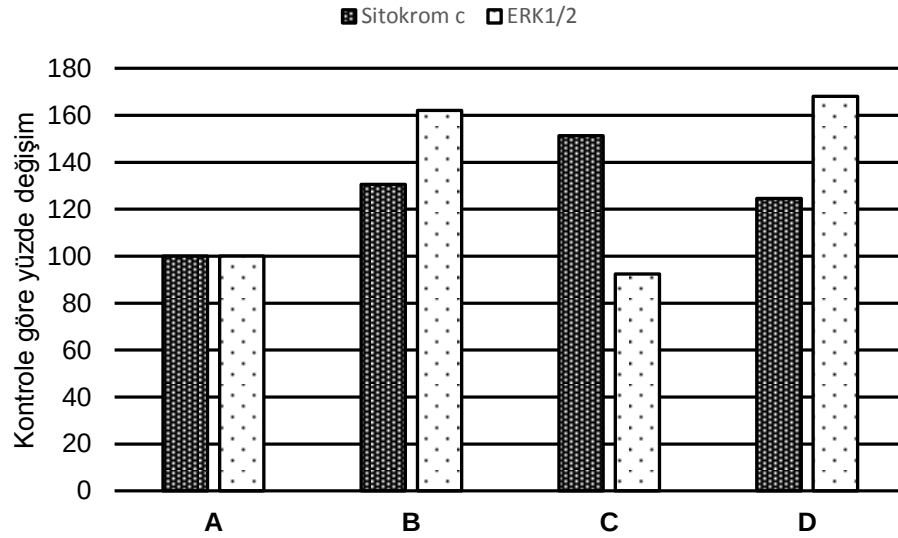
Resim 4.3 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimler ( — 200µm).

Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da sitokrom c ve ERK1/2 protein derişimlerinde meydana gelen değişimler Resim 4.4 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

Sitokrom *c* ve ERK1/2 protein derişimleri tüm etki gruplarında kontrole oranla artış göstermiştir. İstisnai bir durum olarak 100 katı norfluoksetin grubunda ERK1/2 protein derişimi, kontrol grubu düzeylerinde idi (Resim 4.4, Şekil 4.2).



Resim 4.4 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da sitokrom *c* ve ERK1/2 protein derişimi analizine ait jel görüntüleri (A: Kontrol; B: 100XFluoksetin; C: 100XNorfluoksetin; D: 100XFluoksetin+100XNorfluoksetin)



Şekil 4.2 Fluoksetin ve metaboliti olan norfluoksetinin çevresel derişiminin 100 katının subakut etkisinde *D. magna*'da sitokrom *c* ve ERK1/2 protein derişiminin kontrole göre yüzde derişimi (A: Kontrol; B: 100XFluoksetin; C: 100XNorfluoksetin; D: 100XFluoksetin+100XNorfluoksetin)

#### 4.2. Tartışma

Hem aktif madde hem de metabolitler olarak terapötik ajanlar, başta sucul bileşenler olmak üzere çevrede belirlenmeye başlanmıştır. Bu bileşikler her ne kadar memeliler ve diğer hedef organizmalarda spesifik bir yapısal ya da işlevsel birimi etkileyerek yarar sağlamak üzere kullanılsalar da bunların hedef olmayan organizmalar üzerine çok farklı mekanizmalar ile etki edebilme potansiyeli bulunmaktadır [83]. Toksikant, temel bir mekanizmaya, örneğin sinyal iletim mekanizmasına etki ediyorsa evrimsel olarak korunmuş yapıları nedeni ile hedef olmayan organizmalarda farklı yanıtların oluşabilmesine yol açmaktadır [83]. Çalışmamızda etkisi denenen toksikant fluoksetin, selektif serotonin geri kazanım inhibitörü olarak birçok fizyolojik işlevin etkilenmesine neden olmaktadır [84]. *D. pulex*'de serotonin üretim, reseptör ve taşıyıcılarına ait genlerin varlığı belirlenmiş [24], fluoksetinin hedefi olan serotonin taşıyıcılarının Crustacea'leri de kapsayan diğer omurgasızlarda farklı fizyolojik etkilere neden olabileceği bildirilmiştir [58].

Organofosfatlı insektisit chlorpyrifos etkisinde karides *Palaemonetes argentinus*'un abdomen dokusunda artan sitozolik ChE aktivitesinin toksikant etkisine bir çeşit adaptif yanıt olduğu bildirilmiştir [85]. Fluoksetin, norfluoksetin ve bunların karışımı, denenen tüm derişimlerinde ve sürelerde tChE aktivitesini artırmıştır. İstisna olarak çevresel derişiminin 10 katında norfluoksetin ayrı ya da fluoksetin ile karışım halinde aktivitede herhangi bir değişime neden olmamıştır. Fluoksetinin de içerisinde yer aldığı spesifik serotonin geri kazanım inhibitörleri insan serum ve eritrosit membranında AChE ve BChE inhibitörüdür ve fluoksetin bunlar arasında en düşük inhibisyon oranına sahiptir [86]. Benzer olarak, 7 gün 0.5 ve 5 µg/L fluoksetin etkisindeki *D. magna*'da AChE aktivitesinin azaldığı belirlenmiştir [44]. Yazarlar, AChE enziminin fluoksetin etkisinde değişimine ilişkin, uygulanan derişim ve süre gibi deneysel koşulların etkili olabileceğini ve bu konuda daha ileri çalışmalar yapılması gerekliliğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada, Ding vd. [44]'nin çalışmasının aksine daha düşük derişimleri daha uzun sürede, ya da ara bir derişimi daha kısa sürede uyguladık. Analiz yaptığımız örnekler de yaş olarak daha ileri idi. Fluoksetin düşük dozlarında deniz tarağı *V. philippinarum*'da solungaç

AChE aktivitesini azaltırken yüksek dozlarda enzim üzerine herhangi bir etki göstermemektedir [59]. Çalışmamızda herhangi bir inhibitör kullanarak *D. magna*'da var olan kolinesteraz tipini ayırmadık. Bu nedenle tChE aktivitesi içerisinde AChE aktivitesinin oranı hakkında herhangi bir bilgiye sahip değiliz. Her ne kadar kolinesteraz tipini ayırmamış olsa da, Jemec vd. [87], düşük derişimlerinde  $Cd^{2+}$ 'nin AChE aktivitesini artırdığını, artan derişimlerde ise düşük derişimlere oranla aktivitedeki artışın yavaşladığını bildirmiştir. Li ve Tan [88], organofosfatlı insektisit triazophos ve chlorpyrifosun *D. magna*'da ChE aktivitesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, hem asetiltiyokoliniyodür hem de butiriltiyokoliniyodür ile aktivite olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada, iki toksikantın hormetik etkili olarak düşük dozlarında ChE aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Antikolinesterazların etkisinde ChE aktivitesindeki artışın, bir çeşit adaptif mekanizma ile *de novo* sentez sonucu homeostazı sürdürmek üzere meydana geldiğini bildirmişlerdir. 120 ve 750  $\mu g/L$  fluoksetin etkisindeki yengeç *C. maenas*'da kas dokusunda ChE aktivitesinde artış meydana gelmiştir [60]. ChE aktivitesindeki indüksiyonun, serotoninin omurgasızlarda asetilkolin salınımını artırmasına bir yanıt olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, *in vitro* ve *in vivo* apoptotik uyarıların AChE aktivitesinde artış meydana getirdiği genel bilinen bir olgudur [89]. Bu nedenle AChE aktivitesindeki artışın apoptoz için bir biyomarker olması gerektiği önerilmektedir [89]. 75 ng/L fluoksetinin 3 gün etkisinde kalan midye *M. galloprovincialis*'de solungaç dokusunda AChE aktivitesinde artış meydana gelmiş, fluoksetinin olasılıkla solungaç hücrelerinde apoptozu tetikleyerek bu artışa neden olabileceği önerilmiştir [61]. Norfluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı ve bu derişimin karışımı grupları dışında tüm gruplarda gözlenen tChE aktivitesindeki artışın, her ne kadar düzeylerini ölçmesek de olası asetilkolin salınımındaki artışa yanıt olarak meydana geldiği ve bunun da artan lipid peroksidasyonu ve GPx enzim aktivitesi ile MMP depolarizasyonu ve artan sitokrom c ve ERK1/2 miktarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Serotonin uygulanan salyangoz *Helisoma trivolvis* nöronlarında intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinde artış olduğu belirlenmiştir [90]. Kerevit *Procambarus clarkii*'de bacak motor nöron preparatlarında intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeylerindeki artışın asetilkolin

salınımını stimule ettiği saptanmıştır [91]. Aslında plazma membran depolarizasyonu ile indüklenen intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinde artış, nöroiletici salınımında anahtar role sahiptir [91]. Deniz yumuşakçası *Aplysia californica*'da abdominal gangliyonun spesifik serotonerjik nöronlarında serotoninin, asetilkolinin uyarıcı etkisini artırdığı belirlenmiştir [92]. Yengeç *Cancer borealis*'in dorsal gangliyon preparatlarında serotonin ve asetilkolinin birlikte  $Ca^{2+}$  alınımlarını indüklediği belirlenmiştir [93]. Bu verilerden yola çıkarak serotonin indüklü  $Ca^{2+}$  alınımlarının asetilkolin salınımına yol açtığı ve asetilkolinin serotonin ile sinerjistik olarak intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeylerini artırarak oksidatif stres gibi ileri etkilere neden olabileceği öne sürülebilir. Asetilkoline yapısal benzerlik gösteren insektisit imidacloprid etkisinde artan tChE aktivitesinin asetilkolin-indüklü ROS oluşumuna karşı adaptif bir yanıt olduğu bildirilmiştir [94]. Yang ve Dettbarn, antikolinerjik insektisit diisopropylphosphorofluoridate (DFP) etkisinde sıçan diyafram dokusunda AChE inhibisyonu nedeniyle artan asetilkolinin, ROS oluşumu yoluyla lipid peroksidasyonu düzeylerini artırdığını bildirmiştir [95].

Chlorpyrifos etkisindeki *P. argentinus*'un abdomen dokusunda sitozolik ChE aktivitesi,  $H_2O_2$  düzeyleri ile GPx aktivitesinde artış meydana gelmesine karşın lipid peroksidasyonu düzeyleri değişmemiştir [85]. Çalışmamızda artan tChE aktivitesine paralel olarak artan lipid peroksidasyonu düzeyleri nedeniyle, fluoksetin ve norfluoksetin etkisi ile artan serotonin düzeyinin intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeylerini artırma ve dolayısıyla asetilkolin salınımını indükleme potansiyeli sonucu, olası intraselüler  $Ca^{2+}$  homeostazında değişime, oksidatif strese ve olası apoptoz gelişimine yol açmış olabileceği düşünülmektedir. *D. magna*'da  $AgNO_3$  nanopartiküllerinin etkisinde intraselüler ve sodyum selenate etkisinde intramitokondriyal  $Ca^{2+}$  düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir [96, 97]. Yüksek intraselüler  $Ca^{2+}$  düzeyleri mitokondrilerde hasar oluşturabilir [98, 99] ve endoplazmik retikulum gibi intraselüler depolardan salınma ya da hücre içine net  $Ca^{2+}$  girişi gibi etkenler ROS üretimini ve hücre ölümünü tetikleyebilir [98, 100]. Oksidatif strese karşı koymak üzere ilk savunma hattında yer alan GPx enzim aktivitesi [32], kronik çevresel derişimler dışında tüm uygulamalarda artış göstermiştir. GPx,  $H_2O_2$  ve organik peroksidlerin GSH ile tepkimesi sonucu GSSG oluşumunu sağlayan enzimdir [32] ve GSH'ın

rejenerasyonundaki aksama sonuçta oksidatif strese yol açmaktadır. Bulgumuzun aksine, 120 ve 750 µg/L fluoksetin derişimlerinin etkisindeki yengeç *C. maenas*'da hepatopankreas dokusunda lipid peroksidasyonu düzeyleri ile GPx aktivitesi değişmezken, total glutatyon (tGSH, endojen antioksidant molekül), GR ve GST aktivitelerinde artış ölçülmüştür [60]. GST, lipid peroksidasyonu ürünlerinin GSH ile konjugasyonunu sağlayarak peroksidasyon zincir tepkimesinin sonlandırılmasını sağlayan önemli bir enzimdir. GR ise, artan GPx aktivitesi nedeniyle GSSG'yi, NADPH varlığında, en önemli endojen antioksidant olan GSH'a indirgeyen enzimdir. Mesquita vd. [60], yengeç *C. maenas*'da hepatopankreas dokusunda Krebs döngüsünün önemli bir enzimi olan izositrat dehidrojenaz aktivitesi artışı ile NADPH düzeylerinin korunmasına bağlı olarak oksidatif stresin azaldığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda etkisi ayrı ve karışım halinde araştırılan fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin çevresel derişimlerinin 10 katının kronik etkisinde ve 100 katının subakut etkisinde lipid peroksidasyonu düzeylerinde ve GPx aktivitesinde artış belirlenmiştir. İntraselüler ROS artışını gösteren bu parametrelerin farklı toksikantların etkisinde arttığını gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır. Aslında fluoksetin, uygulanan derişim, süre ve uygulandığı yaş aralığından bağımsız *D. magna*'da antioksidant savunmanın uyarılmasına neden olmaktadır. Örneğin, 7 gün 0.5 µg/L fluoksetin etkisinde *D. magna*'da SOD enzim aktivitesi artıp lipid peroksidasyonu azalırken, 5 µg/L fluoksetin etkisinde SOD aktivitesi düşmektedir [44]. Paraquat, endosulfan pestisitleri ile Cd ve Cu ağır metallerinin etkisinde *D. magna*'da GPx aktivitesinin derişime bağlı arttığı, lipid peroksidasyonunun yalnızca Cu etkisinde yükseldiği belirlenmiştir [101]. Asetilsalisilik asit etkisindeki *D. magna*'da GPx aktivitesi ile lipid peroksidasyonu düzeylerinin derişime bağlı arttığı saptanmıştır [102]. Metabolizması sırasında açığa çıkan ROS nedeniyle, asetilsalisilik asidin *D. magna*'da oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda çevresel derişiminin 10 katının ayrı ve fluoksetin ile birlikte kronik etkisinde norfluoksetin, tChE aktivitesini değiştirmemiş ve GPx aktivitesinin artışına bağlı olmayan bir şekilde lipid peroksidasyonu ve diğer biyokimyasal ve moleküler parametrelerde değişime yol açmıştır. tChE aktivitesindeki artışın, olası hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeylerindeki artışa, GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonu ile

belirlenen artan ROS düzeylerine yanıt olduğu tartışılrsa da farklı toksikantların etkisinde *D. magna*'da bu parametrelerin farklı yanıtlar gösterebildiği de belirlenmiştir. Ağrı kesiciler diclofenac ve asetaminofen etkisindeki *D. magna*'da GPx ve tChE aktivitesinde meydana gelen azalmanın, artan ROS düzeyleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [122]. Aynı çalışmada, antipsikotik chlorpromazine ve antihipertansif propranolol etkisinde tChE aktivitesinde değişim olmadığı halde GPx aktivitesinde azalma belirlenmiştir. Olasılıkla artan ROS derişimlerine bağılı olarak her iki enzimin aktivitesinde kayıp olduğu belirtilmektedir.

Mitokondriler, iç membranları boyunca proton gradienti oluşturarak bir membran potansiyeli üretmek üzere, okside edilebilir substratları kullanır [103]. Fluoksetin, norfluoksetin ve bunların çevresel derişimlerinin 100 katının subakut uygulandığı gruplarda total protein miktarında azalma meydana gelmiştir. Herbisit tebuconazole etkisindeki *D. magna* örneklerinde total protein miktarının derişime ve süreye bağılı olarak azaldığı belirlenmiştir [104]. Toksik stres koşullarında artan enerji gereksinimlerini karşılamak üzere artan protein katabolizmasının tebuconazole etkisi için önemli bir biyomarkır olabileceği önerilmektedir. Villarroel vd. [105], akarisit tetradifon etkisindeki *D. magna*'da fizyolojik bir adaptasyon olarak doku proteinlerinin proteolize uğradığını, açığa çıkan serbest aminoasitlerin enerji üretimini sürdürebilmek için Krebs döngüsüne okside edilebilir substratlar olarak iletildiğini bildirmiştir. Total protein miktarı yengeç *Barytelphusa guerini*'de solungaç, kas, hepatopankreas ve nöral gangliyon dokularında chlorpyrifos etkisi ile azalırken, serbest aminoasit miktarı ile aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz enzim aktiviteleri artmıştır [106]. Bu çalışmadaki bulgumuzun aksine, 80 µg/L fluoksetinin 24 saat etkisinde ergin *D. magna*'da protein ve lipid miktarlarının etkilenmediği, buna karşın karbohidrat miktarının azaldığı ve oksijen tüketim oranının arttığı belirlenmiştir [58]. Spesifik serotonin geri kazanım inhibitörleri, oksijen tüketim oranındaki artış nedeniyle aerobik metabolizmanın artışı sağlamakta [58], bu da olasılıkla daha fazla ROS üretimine yol açmaktadır [107]. Oksijen tüketiminde artış ve karbohidrat miktarında azalma 10 µg/L fluoksetin etkisindeki *D. magna*'da da gösterilmiştir [57]. Fluoksetin ve norfluoksetinin subakut etkisindeki *D. magna*'da, artan GPx aktivitesi ve lipid peroksidasyonu düzeyleri



nedeniyle, protein miktarındaki azalmanın, aşırı ROS üretimi sonucu meydana gelen oksidatif hasarın bir sonucu olduğu da ileri sürülebilir [108]. Benzer bir bulgu, chlorpyrifos etkisindeki *P. argentinus*'da elde edilmiştir [85]. Abdomen dokusunda artan ChE ve GPx aktivitesi yanında protein karbonil miktarında da artış meydana gelmiştir. Oksidatif stresin bir göstergesi olan protein karbonil oluşumu, bu şekildeki okside proteinlerin proteozomal yıkımı ile sonuçlanmaktadır [109].

Mitokondriyal membran depolarizasyonu, hücre ölümünü belirlemek için yaygın kullanılan markırlardan bir tanesidir [103, 110, 111] ve hücre ya da dokuların fizyolojik durumları hakkında bilgi vericidir [111]. Norfluoksetinin izole kalp mitokondri preparatlarında düşük dozlarından başlayarak MMP depolarizasyonuna ve kompleks I aktivitesinde inhibisyona neden olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek dozlarda elektron transfer zinciri bileşenlerini inhibe ederek oksijen tüketiminde de azalmaya yol açmıştır [112]. Yazarlar, MMP depolarizasyonunun nedenini norfluoksetin etkisiyle elektron transfer zinciri inhibisyonu sonucu olası ROS artışına bağlamışlardır. Valinomycin ve cereulide gibi çeşitli toksinlerin etkisinde *D. magna*'da JC1 ile ölçülen MMP'de depolarizasyon bildirilmiştir [62]. <24 saat *D. magna* örneklerinde JC1 ile ölçülen MMP depolarizasyonu nedeni ile AgNO<sub>3</sub> nanopartiküllerinin mitokondriyal hasara yol açtığı belirlenmiştir [63]. Organofosfatlı bir insektisit olan malathionun düşük derişimlerinin etkisinde balık *Ctenopharyngodon idellus* epidermis hücre hattında MMP depolarizasyonu yanında artan ROS ve intraselüler Ca<sup>2+</sup> ile azalan ATP düzeylerine eşlik eden apoptoz gelişimi bildirilmiştir [113]. Çalışmamızda fluoksetin, norfluoksetin ve bunların karışımları, tüm süre ve derişimlerde mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olmuştur. Kronik etkide en belirgin değişim, özellikle norfluoksetin uygulanan gruplarda iken, subakut etkide tüm gruplarda değişim şiddetlidir. Düşük tuzluluk koşullarında ve Cu etkisinde bulunan yengeç *Neohelice granulata*'da anteriyor solungaç dokusunda heksokinaz, piruvat kinaz, fosfofruktokinaz ve sitrat sentaz enzim aktiviteleri ile MMP'nin azaldığı, laktat dehidrojenaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir [114]. Enzim aktivitelerindeki ve MMP'deki düşüş nedeniyle enerji üretim modunun aerobikten anaerobiğe kaydığı ve ATP üretiminin bu nedenle azaldığı önerilmiştir. Açlık gibi farklı stres kaynaklarının etkisi altındaki tatlı su

karidesi *Neocaridina heteropoda*'da barsak ve hepatopankreas epitel hücrelerinde MMP depolarizasyonuna sahip mitokondri sayısının oldukça düşük olduğu ve etkin bir otofaji mekanizması ile hücrelerin ölümünün engellendiği bildirilmiştir [111].

MMP depolarizasyonu memelilerde mitokondriden sitokrom *c* salınımından sorumlu önemli bir mekanizmadır [103] ve memelilerde sitokrom *c* salınımı hücrelerin mitokondriyal apoptozu için önemli bir başlatıcı faktördür [115]. Ekstrem anoksik koşullara dayanıklı *Artemia franciscana* embriyolarının izole mitokondrilerinde aşırı  $Ca^{2+}$  yüklemesine karşın sitokrom *c* salınımının gerçekleşmediği; buna karşın,  $HgCl_2$  etkisinde mitokondriyal membran şişmesi ve sitokrom *c* salınımı meydana geldiği belirlenmiştir [116]. Bu canlılarda aşırı  $Ca^{2+}$  yüklemesi, memeli mitokondrilerinin aksine büzülme ile sonuçlanmamakta, önceden var olan  $Ca^{2+}$  da atılmamaktadır. Bu özellikleri nedeni ile bu canlıların aşırı anoksik koşullara dayanabildiği önerilmektedir. *D. pulex*'de de  $Ca^{2+}$  yükleme kapasitesinin oldukça yüksektir ve  $Ca^{2+}$  saturasyonu sonrası MPTP oluşumu gerçekleşmemektedir [117]. Bir başka çalışmada, *A. franciscana* embriyolarından izole edilen kaspaz-3 ve kaspaz-9 çözeltilisine sitokrom *c* eklenmesi, aktivitede herhangi bir değişime neden olmamıştır [118].  $Ca^{2+}$  ilavesi de kaspaz-9 aktivitesini değiştirmemesine karşın, kaspaz-9 aktivitesini etkileyebilecek proteazların aktivasyonuna yol açması nedeniyle  $Ca^{2+}$ , bu apoptoz başlatıcı proteinler için allosterik etkili olabilir [118]. Tüm bu verilere karşın Crustacea apoptozomunun moleküler yapısı anlaşılmadan sitokrom *c*'nin apoptozdaki rolünün dışlanmaması gerektiği önerilmektedir [41]. *D. magna* da *A. franciscana* embriyoları gibi kısa süreli anoksiyaya ve şiddetli hipoksik koşullara dayanıklı bir türdür [27]. Cd etkisindeki istiridye *Crassostrea virginica* hemosit hücrelerinin sitokrom *c* bağımlı kaspaz-3 benzeri enzim aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir [119]. Bu hücrelerde Cd etkisi ile, ATP düzeylerinin azalmasına karşın, MMP'nin değişmediği ve değişmeyen kaspaz-3 aktivitesi nedeniyle sitokrom *c* salınımının gerçekleşmediği saptanmıştır. Cd etkisindeki hücrelerin apoptozu için mitokondriler destekleyici bir mekanizma sunmasına karşın, hemositlerin mitokondrilerden bağımsız olarak apoptoza uğradığı bildirilmiştir [119]. Karides *Litopenaeus vannamei*'de WSS virüs enfeksiyonu sırasında apoptoz-indükleyici faktör (AIF) ve sitokrom *c* gen ifadenmesinin

yanında aktif kaspaz-3 protein miktarı ve transkriptlerinin arttığı belirlenmiştir [120]. Çalışmamızda *D. magna*'da fluoksetinin çevresel derişimi ve 10 katı karışım grubu dışında tüm kronik ve subakut uygulamalarda sitokrom c derişimi artmıştır. Aslında ölçtüğümüz toplam sitokrom c derişimi mitokondrilerden salınım ve apoptoz konusunda yeterli aydınlatıcı bilgiye ulaşmamızı sağlayamaz. Buna karşın, MMP depolarizasyonu, artan ROS ve sitokrom c miktarı nedeni ile fluoksetin ve metaboliti norfluoksetinin en azından çevresel derişimlerinin 10 katı kronik ve çevresel derişimlerinin 100 katı subakut etkide apoptoza yol açabileceğini önerebiliriz. Düşük derişim Cd etkisindeki yengeç *Sinopotamon henanense*'de hepatopankreas dokusunda kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinde artış ve MMP hiperpolarizasyonu yoluyla hücrelerin mitokondriyal apoptoza uğradıkları belirlenmiştir [121]. Bu canlıların hücrelerinde sitokrom c miktarında herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Aksine, yüksek Cd derişiminin etkisi MMP depolarizasyonu ve sitokrom c azalmasına karşın kaspaz-3, -8 ve -9 aktivitelerinde derişim bulunamamıştır [121]. Sitozole atılan sitokrom c yeniden absorbe edilerek ya da yeniden sentezlenerek, mitokondriler hasardan korunmaya çalışırlar. Artan strese bağlı olarak sitokrom c absorpsiyonu durur ve daha fazla mitokondri hasar görür [121].

ERK1/2, transkripsiyon faktörlerinin regülasyonu ya da bazı proteinlerin doğrudan fosforilasyonu yoluyla hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının, kasılmanın, transportun, hasara yanıtın ve apoptozun düzenlenmesinde rol alır. Farklı toksikantların etkisi ile aktif hale gelir ve hücre hasara karşı yanıtta rol oynar [123]. Tetrabromobisphenol A etkisindeki midye *M. galloprovincialis*'de hemositlerde ERK2 fosforilasyonu, *E. coli*'ye karşı lizozomal enzim salınımı, fagositik aktivite artışı ve ekstraselüler süperoksit anyon radikali üretimi yoluyla mikrobisidal aktivitenin artışına neden olmuştur [124]. Crustacea'lerde ERK1/2 işlevi genellikle kabuk derişimi [125], spermatogenez [126] ve oogenezdaki [127] etkileri bağlamınca araştırılmıştır. Memeli hücrelerinde ERK1/2'nin dahil olduğu sinyal yolağı, mitokondriyal transmembran potansiyeli derişimi ve sitokrom c salınımının öncesi, sonrası ya da bunlarla ilişkisiz bir şekilde apoptozun inhibisyonunda görev alır [43]. Aslında ERK1/2 genellikle hücre sağkalımını

desteklerken belirli koşullar altında pro-apoptotik olabilmektedir [43]. Örneğin, *t*-bütil hidroperoksid etkisindeki tavşan renal proksimal tübüler hücrelerinde ERK1/2 aktivasyonu MMP depolarizasyonuna, inhibisyonu enerji üretiminin ve mitokondriyal membran potansiyelinin korunmasına neden olmuştur [123]. Fluoksetin insan hepatokarsinoma hücrelerinde MMP depolarizasyonu, mitokondriyal  $Ca^{2+}$  yük artışı ve ROS oluşumu yoluyla ERK1/2 miktarının azalmasına neden olmakta, böylece bu hücreler apoptoza uğramaktadır [128]. Çalışmamızda fluoksetin, norfluoksetin çevresel derişimleri ve bunların karışımlarının etkisinde sitokrom c artışı ve MMP depolarizasyonuna karşın, lipid peroksidasyonu düzeyleri ve GPx aktivitesinin yanında ERK1/2 miktarı da değişmemiştir. Aksine, daha yüksek derişimlerde sitokrom c miktarı, lipid peroksidasyonu ve GPx aktivite artışı ve MMP depolarizasyonuna ERK1/2 artışı eşlik etmektedir. Buna göre ERK1/2 miktarındaki artış olasılıkla hücre sağkalımını desteklemek üzere adaptif bir yanıttır. Subakut norfluoksetin etkisinde ERK1/2 miktarında derişim meydana gelmemiştir ve norfluoksetinin farklı derişimlerine oluşturulan farklı yanıtların daha ileri çalışmalar ile ayrıntılandırılması gerekmektedir.

Üç gün süre ile yüksek derişim  $Ni^{2+}$  etkisinde kalan *D. magna*'da hücrel enerji oranındaki azalma ile orantılı olarak karapaks uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir [129]. Düşük derişim  $Ni^{2+}$  etkisinde ise etkinin 4. gününde karapaks uzunluğunun azaldığı bildirilmiştir. Çalışmamızda fluoksetinin çevresel derişimlerinin 10 katının ve norfluoksetin ile karışımının 10 katının kronik etkisinde sırasıyla 3. dölde ve 2. ve 3. dölde karapaks uzunluğunda artış meydana gelmiştir. Av olan canlılar avcılarından kaçınmak üzere morfolojik (örneğin diken ve zırh), yaşam döngüsü derişimi (örneğin geç yavru üretme), fizyolojik (örneğin toksin üretimi) ve avcıdan kaçınma davranışları gibi davranışlar sergilerler [130]. Bu gruplarda fluoksetin ve metaboliti ile karışımının annelerde bir çeşit avcıdan kaçınma davranışını tetiklediği düşünülebilir. Buna karşın diğer tüm etki gruplarında <24 saat yavruların karapaks uzunluğunda azalma belirlenmiştir. Etki özellikle 4. ve 5. döl yavrularında ortaya çıkmıştır.  $TiO_2$  nanopartiküllerinin 21 gün süre ile etkisindeki *D. magna*'da süre sonunda karapaks uzunluğunun derişime bağlı azalma gösterdiği

belirlenmiştir [81]. Non-steroid omurgalı östrojeni diethylstilbesterol (DES) ve böcek juvenil hormon analogu methoprenenin 3 ve 6 günlük etkisinde hem dişi hem de erkek *D. magna* örneklerinde karapaks uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir [131]. Herbisit glyphosate (saf) ve ticari formülasyonu Roundup etkisinde *D. magna*'da hem juvenil (<24 saat) hem de anaçların yaşam süresinin farklı zamanlarında derişime bağı olarak karapaks uzunluğunda azalma olduğu saptanmıştır [132]. Herbisit Roundup etkisinde *D. magna*'da juvenil (<24 saat) yavrularda ve 15 gün sonunda anaçlarda karapaks uzunluğunun azaldığı ve en belirgin etkinin 1. dölde olduğu belirlenmiştir [133]. Her döl yavrularında amilaz ve sükraz aktiviteleri derişime bağı azalırken, proteaz enzim aktivitesi derişime bağı artış göstermiştir. Bu nedenle *D. magna* yavrularının Roundup etkisinin, ardışık döllerde adaptasyon potansiyelini azalttığı önerilmiştir [133]. Kronik Cu etkisindeki *D. magna*'da juvenil (<24 saat) karapaks uzunluğu azalırken, anaçların yavru üretim potansiyelinde herhangi bir değışim meydana gelmemiştir [134]. 3 ve 10 µg/L fluoksetin etkisindeki *D. magna*'nın 3. döl juvenil yavrularında karapaks uzunluğu değışmezken, 30, 100 ve 300 µg/L fluoksetin etkisinde derişime bağı azaldığı belirlenmiştir [54]. Fluoksetin etkisinin juvenil sağılığını ve dolayısıyla verimli döl verme olasılığını azalttığı belirtilmiştir. Düşük besin koşullarında 40 µg/L fluoksetin yavru üretim oranını artırırken vücut büyüklüğünün azalmasına neden olmuştur [58]. Küçük yapılı yavru üretiminin uygun olmayan bir adaptasyonel yanıt olduğu bildirilmiştir [135]. Çalışmamızda fluoksetin ve norfluoksetinin çok daha düşük derişimlerinde karapaks uzunluğunun genel olarak azaldığını belirledik. Maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğu, genel olarak karapaks uzunluğuna paralel değışim göstermiştir. Bu nedenle bu parametrelerin de fluoksetin etkisi için önemli belirleyiciler olabileceğı önerilmektedir.

Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) etkisindeki *D. magna*'da azalan total protein miktarına bağı olarak yavru üretim potansiyelinde de düşüş meydana gelmiştir [136]. Herbisit Roundup etkisiyle *D. magna*'da her dölde yavru üretme potansiyelinin azaldığı belirlenmiştir [133]. Bu durum, juvenillerde azaldığı gibi anaçlarda da sindirim ile ilişkili enzim aktivitelerindeki olası azalmaya bağlanabilir. Çalışmamızda norfluoksetinin çevresel derişiminin 10 katı uygulanan grupta 2. dölde

ve genel yavru üretim ortalamasında azalma meydana gelmiştir. Norfluoksetinin yer aldığı tüm karışım gruplarının 5. dölünde de aynı grupların diğer dölllerinden farklı olarak yavru üretme potansiyeli azalmıştır. Bu durum fluoksetin uygulanan gruplara oranla norfluoksetin grubundaki anaçlarda meydana gelen biyokimyasal ve moleküler değişimlere bağlanabilir. Fakat, norfluoksetinin bu etkisi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır. Norfluoksetinin etkisi yüksek derişim fluoksetinin yavru üretimini azaltma potansiyeline benzemektedir. Norfluoksetin, ana bileşik fluoksetine göre çok daha potent ve insan plazmasında yarılanma ömrü çok daha uzundur (fluoksetin 1-3 gün ve norfluoksetin 7-15 gün) [137]. 100 µg/L fluoksetin etkisinde *D. magna*'da 21 ve 40 gün sonunda toplam yavru sayısının azaldığı belirlenmiştir [55]. 241 µg/L fluoksetin etkisinde *D. magna*'da 21 gün sonunda yavru üretim sayısının azaldığı belirlenmiştir [54].

Çalışmamızda kronik çevresel derişimlerinde fluoksetin, norfluoksetin ve çevresel derişiminin 10 katında fluoksetin ve karışım gruplarında *D. magna*'da yavru üretim potansiyelinde artış meydana gelmiştir. 36 µg/L fluoksetinin 30 gün etkisinde *D. magna*'da 1., 2., 5. ve 6. döllerde karapaks uzunluğu değişmeksizin yavru üretim sayısında artış meydana geldiği belirlenmiştir [3]. Benzer şekilde, 40 ve 80 µg/L fluoksetinin etkisinde karapaks uzunluğu etkilenmeksizin *D. magna*'da yavru üretim sayısının arttığı belirlenmiştir [58]. Fluoksetinin serotoninin kullanılabilirliğini artırarak yavru üretimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Serotonin reseptör antagonisti siproheptadin, fluoksetin etkisi ile yavru üretim sayısındaki artışı engellemektedir [58]. Serotoninin Crustacea'de üreme, büyüme, erginleşme, larval gelişim, immun işlevler, metabolizma, davranış ve renk fizyolojisi gibi çok farklı işlevlere ait nörohormonları etkilediği bilinmektedir [22].

**5. SONUÇ ve ÖNERİLER**

1. Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin, çevresel derişimleri ve bunun katları olan derişimlerde kronik ve subakut olarak tChE aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Bu durumun serotoninin intraselüler  $Ca^{2+}$  derişimlerini artırarak asetilkolin salınımını etkilemesi sonucu olduğu düşünölmektedir.
2. Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin çevresel derişimlerinin 10 katı kronik ve 100 katı subakut etkide antioksidant yanıtın uyarılmasına ve oksidatif strese neden olmaktadır. Etki çevresel derişimin 100 katında daha belirgindir.
3. Fluoksetin ve metaboliti norfluoksetin etkisi denenen tüm süre ve derişimlerde MMP depolarizasyonuna neden olmuştur. Bu durum, her iki bileşğin ROS üretme potansiyeli nedeniyle olabilir.
4. Sitokrom c protein miktarı fluoksetinin çevresel derişimi ile 10 katı karışım grubu dışındaki tüm gruplarda artmıştır. Bu artış, kaspaz-3 ya da kaspaz-9 aktivitesi ile ilişkili bir şekilde apoptoza yol açabilir. Fakat, özellikle *Daphnia spp.*'de apoptoz ile ilişkili genlerin varlığı bilinse de [138] moleküler etkileşim mekanizması yeterince aydınlatılamadığından kesin bir sonuca ulaşmak zordur.
5. ERK1/2 protein miktarı çevresel derişimler dışındaki yüksek derişimlerin etkisinde ve tüm sürelerde artış göstermiştir. Bu artışın, oksidatif stres, MMP depolarizasyonu ve sitokrom c artışına adaptif bir yanıt olduğu önerilmektedir.
6. Norfluoksetin en belirgin MMP depolarizasyonu, tChE aktivitesinde değişim olmaksızın oksidatif stresin meydana gelmesi, çevresel derişimlerinden başlayarak sitokrom c artışı, uygulandığı gruplarda yavru üretim sayısının düşmesi gibi nedenlerle fluoksetin etkisinden farklılık göstermiştir. Bu farklılık olasılıkla bu bileşğin ana bileşik fluoksetine göre daha potent serotonin geri kazanım inhibitörü olması ve yarı ömrünün daha fazla olması ile ilişkilidir.
7. Fluoksetin, norfluoksetin ile karışım grupları dahil tüm sürelerde genel olarak karapaks uzunluğu, maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğunda azalmaya neden olmuştur. Maksimum karapaks genişliği ve kaudal spina uzunluğu bu ve diğer toksikantların etkisini belirlemede kullanışlı parametreler olarak önerilmektedir.

8. Fluoksetin, norfluoksetin ile karışım grupları dahil tüm sürelerde, beklenildiği gibi genel olarak yavru üretim sayısında artışa neden olmuştur. Norfluoksetinin uygulandığı gruplarda gözlenen azalmanın ileri çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.
9. Daphnia türlerinin, yalnızca morfolojik özellikleri ile değil, moleküler ve biyokimyasal karakterleri ile model organizma olarak kullanımı yararlıdır. Fakat, omurgalılarda olduğu gibi, hücresel mekanizmaların aydınlatılması gereksinimi hala devam etmektedir.
10. Pestisitler, ağır metaller ve farmasötikler gibi farklı ksenobiyotiklerin hedef olmayan organizmalarda ayrı ve karışım halinde değerlendirildiği çalışmalar değerli bilgiler sunmaktadır. Farmasötiklerin hedef olmayan sucul canlılara toksisitesinin, metabolitlerinin varlığında değerlendirilmesi de bilgi birikimimize önemli katkılar yapma potansiyeline sahiptir.



## KAYNAKLAR

- [1] S. Snyder, C. Lue-Hing, J. Cotruvo, J. E. Drewes, A. Eaton, R. C. Pleus ve D. Schlenk, *Pharmaceuticals in the Water Environment*. Association of Metropolitan Water Agencies, 2009.
- [2] K. Kümmerer, "The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges," *Journal of Environmental Management*, vol. 90, no. 8, pp. 2354-2366, 2009.
- [3] C. M. Flaherty ve S. I. Dodson, "Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction," *Chemosphere*, vol. 61, no. 2, pp. 200-207, 2005.
- [4] J. Weinberger ve R. Klaper, "Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 151, pp. 77-83, 2014.
- [5] A. B. A. Boxall, V. D. J. Keller, J. O. Straub, S. C. Monteiro, R. Fussell ve R. J. Williams, "Exploiting monitoring data in environmental exposure modelling and risk assessment of pharmaceuticals," *Environ. Int.*, vol. 73, pp. 176-185, 2014.
- [6] A. Pal, Y. He, M. Jekel, M. Reinhard ve K. Y. H. Gin, "Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle," *Environ. Int.*, vol. 71, pp. 46-62, 2014.
- [7] D. Fatta-Kassinos, I. K. Kalavrouziotis, P. H. Koukoulakis ve M. I. Vasquez, "The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment," *Sci. Total Environ.*, vol. 409, no. 19, pp. 3555-3563, 2011.
- [8] E. R. Cooper, T. C. Siewicki ve K. Phillips, "Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment," *Sci. Total Environ.*, vol. 398, no. 1-3, pp. 26-33, 2008.
- [9] M. S. Kostich ve J. M. Lazorchak, "Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use," *Sci. Total Environ.*, vol. 389, no. 2-3, pp. 329-339, 2008.
- [10] A. Rossi, A. Barraco ve P. Donda, "Fluoxetine: A review on evidence based medicine," *Ann. Gen. Hosp. Psychiatry*, vol. 3, pp. 1-8, 2004.
- [11] P. E. Stokes ve A. Holtz, "Fluoxetine tenth anniversary update: The progress continues," *Clin. Ther.*, vol. 19, no. 5, pp. 1135-1250, 1997.
- [12] N. Aydın, M. Çetin, E. Kurt, H. Savaş, C. Açikel, S. Kılıç, C. Başoğlu ve H. Türkçapar, "Psikofarmakoloji Derneği Türkiye'de Psikotrop İlaç Tüketimi ve Mevcut Uygulamaların Tıbbi, Etik ve Ekonomik Sonuçları Raporu," *Bull. Clin. Psychopharmacol.*, vol. 23, no. 4, pp. 390-402, 2013.
- [13] OECD, "Pharmaceutical Market 2000-2017." [Online]. Available: [https://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH\\_STAT](https://stats.oecd.org/index.aspx?DataSetCode=HEALTH_STAT). [Erişim tarihi: 21-Temmuz-2018].
- [14] National Center for Biotechnology Information, "Fluoxetine," *Compound Summary for CID 3386*. [Online]. Available:

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3386>. [Erişim tarihi: 24-Temmuz-2018].
- [15] L. Perez-Caballero, S. Torres-Sanchez, L. Bravo, J. A. Mico ve E. Berrocoso, "Fluoxetine: a case history of its discovery and preclinical development," *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 9, no. 5, pp. 567-578, 2014.
- [16] National Center for Biotechnology Information, "Norfluoxetine," *Compound Summary for CID 4541*. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4541>. [Erişim tarihi: 24-Temmuz-2018].
- [17] G. Nentwig, "Another Example of Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Invertebrates: Fluoxetine and Ciprofloxacin," in *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, K. Kümmerer, Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, pp. 205–222.
- [18] K. Fent, A. A. Weston ve D. Caminada, "Ecotoxicology of human pharmaceuticals," *Aquat. Tox.*, vol. 76, no. 2, pp. 122-159, 2006.
- [19] P. P. Fong, "Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors," *Biol. Bull.*, vol. 194, no. 2, pp. 143-149, 1998.
- [20] W. A. Weiger, "Serotonergic modulation of behaviour: A phylogenetic overview," *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, vol. 72, no. 1, pp. 61-95, 1997.
- [21] A. E. Christie, "Crustacean neuroendocrine systems and their signaling agents," *Cell Tissue Res.*, vol. 345, no. 1, pp. 41-67, 2011.
- [22] P. P. Fong ve A. T. Ford, "The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review," *Aquat. Toxicol.*, vol. 151, pp. 4-13, 2014.
- [23] F. Ehrenström ve R. Berglind, "Determination of biogenic amines in the water flea, *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) and their diurnal variations using ion-pair reversed phase HPLC with electrochemical detection," *Comp. Biochem. Physiol. Part C, Comp. Pharm.*, vol. 90, no.1, pp. 123-132, 1988.
- [24] M. D. McCoole, N. J. Atkinson, D. I. Graham, E. B. Grasser, A. L. Joselow, N. M. McCall, A. M. Welker, E. J. Wilsterman Jr., K. N. Baer, A. R. Tilden ve A. E. Christie, "Genomic analyses of aminergic signaling systems (dopamine, octopamine and serotonin) in *Daphnia pulex*," *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genom. Proteom.*, vol. 7, no. 1, pp. 35-58, 2012.
- [25] H. Sanderson, R. A. Brain, D. J. Johnson, C. J. Wilson ve K. R. Solomon, "Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: Antibiotics, antineoplastics, cardiovascular, and sex hormones," *Toxicology*, vol. 203, no. 1-3, pp. 27-40, 2004.
- [26] H. J. Kim, P. Koedrith ve Y. R. Seo, "Ecotoxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of environmental chemical toxicity using aquatic invertebrate, *Daphnia* model organism," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 12261-12287, 2015.
- [27] N. N. Smirnov, *Physiology of the Cladocera*. London: Academic Press, 2013.
- [28] R. Van der Oost, J. Beyer ve N. P. E. Vermeulen, "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 13, no. 2, pp. 57-149, 2003.

- [29] M. Pohanka, "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.*, vol. 155, no. 3, pp. 219-229, 2011.
- [30] O. Oktyabrsky ve G. Smirnova, "Redox Regulation of Cellular Functions," *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 72, no. 2, pp. 132-145, 2007.
- [31] A. Görlach, K. Bertram, S. Hudecova ve O. Krizanova, "Calcium and ROS: A mutual interplay," *Redox Biol.*, vol. 6, pp. 260-271, 2015.
- [32] N. H. P. Cnubben, I. M. C. M. Rietjens, H. Wortelboer, J. Van Zanden ve P. J. Van Bladeren, "The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 10, no. 4, pp. 141-152, 2001.
- [33] F. Ursini ve M. Maiorino, "Glutathione Peroxidases," *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Elsevier Inc., pp. 224-228, 2004.
- [34] V. B. Djordjević, "Free radicals in cell biology," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 237, pp. 57-89, 2004.
- [35] R. J. Schaur, W. Siems, N. Bresgen ve P. M. Eckl, "4-hydroxy-nonenal-a bioactive lipid peroxidation product," *Biomolecules*, vol. 5, no. 4, pp. 2247-2337, 2015.
- [36] G. Spiteller, "Peroxidation of linoleic acid and its relation to aging and age dependent diseases," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 122, no. 7, pp. 617-657, 2001.
- [37] D. Kültz, "Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 67, pp. 225-257, 2005.
- [38] R. Franco, R. Sánchez-Olea, E. M. Reyes-Reyes ve M. I. Panayiotidis, "Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois," *Mut. Res.*, vol. 674, no. 1-2, pp. 3-22, 2009.
- [39] Q. Yuan, R. M. Ray ve L. R. Johnson, "Polyamine depletion prevents camptothecin-induced apoptosis by inhibiting the release of cytochrome c," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 282, no. 6, pp. C1290-C1297, 2002.
- [40] D. Alvarez-Paggi, L. Hannibal, M. A. Castro, S. Oviedo-Rouco, V. Demicheli, V. Tortora, F. Tomasina, R. Radi ve D. H. Murgida, "Multifunctional Cytochrome c: Learning New Tricks from an Old Dog," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 21, pp. 13382-13460, 2017.
- [41] M. A. Menze, G. Fortner, S. Nag ve S. C. Hand, "Mechanisms of apoptosis in Crustacea: What conditions induce versus suppress cell death?," *Apoptosis*, vol. 15, no. 3, pp. 293-312, 2010.
- [42] R. Roskoski, "ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation," *Pharmacol. Res.*, vol. 66, no. 2, pp. 105-143, 2012.
- [43] Z. Lu ve S. Xu, "ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis," *IUBMB Life*, vol. 58, no. 11, pp. 621-631, 2006.
- [44] J. Ding, H. Zou, Q. Liu, S. Zhang ve R. Mamitiana Razanajatovo, "Bioconcentration of the antidepressant fluoxetine and its effects on the physiological and biochemical status in *Daphnia magna*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 142, pp. 102-109, 2017.
- [45] P. Sehonova, Z. Svobodova, P. Dolezelova, P. Vosmerova ve C. Faggio, "Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review," *Sci. Total Environ.*, vol. 631-632, pp. 789-794, 2018.

- [46] O. Jones, N. Voulvoulis ve J. Lester, "Human pharmaceuticals in the aquatic environment a review.," *Environ. Technol.*, vol. 22, no. 12, pp. 1383-1394, 2001.
- [47] B. W. Brooks, C. K. Chambliss, J. K. Stanley, A. Ramirez, K. E. Banks, R. D. Johnson, R. J. Lewis, "Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 24, no. 2, pp. 464-469, 2005.
- [48] C. D. Metcalfe, S. Chu, C. Judt, H. Li, K. D. Oakes, M. R. Servos ve D. M. Andrews, "Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, no. 1, pp. 79-89, 2010.
- [49] D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber ve H. T. Buxton, "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1202-1211, 2002.
- [50] T. Vasskog, U. Berger, P. J. Samuelsen, R. Kallenborn ve E. Jensen, "Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway," *J. Chromatogr. A*, vol. 1115, no. 1-2, pp. 187-195, 2006.
- [51] T. Vasskog, T. Anderssen, S. Pedersen-Bjergaard, R. Kallenborn ve E. Jensen, "Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway," *J. Chromatogr. A*, vol. 1185, no. 2, pp. 194-205, 2008.
- [52] A. Lajeunesse, C. Gagnon ve S. Sauve, "Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 14, pp. 5325-5333, 2008.
- [53] S. Franzellitti, S. Buratti, M. Capolupo, B. Du, S. P. Haddad, C. K. Chambliss, B. W. Brooks ve E. Fabbri, "An exploratory investigation of various modes of action and potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels," *Aquat. Toxicol.*, vol. 151, pp. 14-26, 2014.
- [54] A. R. R. Pery, M. Gust, B. Vollat, R. Mons, M. Ramil, G. Fink, T. Ternes ve J. Garric, "Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates," *Chemosphere*, vol. 73, no. 3, pp. 300-304, 2008.
- [55] T. O. Luna, S. C. Plautz ve C. J. Salice, "Chronic effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol, fluoxetine, and the mixture on individual and population-level end points in *Daphnia magna*," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 68, no. 4, pp. 603-611, 2015.
- [56] B. Campos, B. Piña, M. Fernández-Sanjuán, S. Lacorte ve C. Barata, "Enhanced offspring production in *Daphnia magna* clones exposed to serotonin reuptake inhibitors and 4-nonylphenol. Stage- and food-dependent effects," *Aquat. Toxicol.*, vol. 109, pp. 100-110, 2012.
- [57] D. Raldua, B. Campos, C. Barata, B. Piña, N. García-Reyero ve P. J. Babin, "Deciphering emerging toxicological effects of pharmaceuticals on aquatic organisms by using *Daphnia magna* and *Danio rerio* as model organisms," *Compr. Anal. Chem.*, vol. 62, pp. 611-647, 2013.
- [58] B. Campos, B. Piña ve C. C. Barata, "Mechanisms of action of selective

- serotonin reuptake inhibitors in *Daphnia magna*,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 5, pp. 2943-2950, 2012.
- [59] M. Munari, M. G. Marin ve V. Matozzo, “Effects of the antidepressant fluoxetine on the immune parameters and acetylcholinesterase activity of the clam *Venerupis philippinarum*,” *Mar. Environ. Res.*, vol. 94, pp. 32-37, 2014.
- [60] S. R. Mesquita, L. Guilhermino ve L. Guimarães, “Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine,” *Chemosphere*, vol. 85, no. 6, pp. 967-976, 2011.
- [61] M. Gonzalez-Rey ve M. J. Bebianno, “Does selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) fluoxetine affects mussel *Mytilus galloprovincialis*?,” *Environ. Pollut.*, vol. 173, pp. 200-209, 2013.
- [62] V. V. Teplova, Z. I. Andreeva-Kovalevskaya, E. V. Sineva ve A. S. Solonin, “Quick assessment of cytotoxins effect on *Daphnia magna* using *in vivo* fluorescence microscopy,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 29, no. 6, pp. 1345-1348, 2010.
- [63] M. C. Stensberg, R. Madangopal, G. Yale, Q. Wei, H. Ochoa-Acuña, A. Wei, E. S. McLamore, J. Rickus, D. M. Porterfield ve M. S. Sepúlveda, “Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*,” *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 8, pp. 833-842, 2014.
- [64] J. Djordjevic, A. Djordjevic, M. Adzic, I. Elaković, G. Matić ve M. B. Radojicic, “Fluoxetine affects antioxidant system and promotes apoptotic signaling in Wistar rat liver,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 659, no. 1, pp. 61-66, 2011.
- [65] S. J. Hahn, J. S. Choi, D. J. Rhie, C. S. Oh, Y. H. Jo ve M. S. Kim, “Inhibition by fluoxetine of voltage-activated ion channels in rat PC12 cells,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 367, no. 1, pp. 113-118, 1999.
- [66] F. Deak, B. Lasztozsi, P. Pacher, G. L. Petheo, K. Valeria ve A. Spat, “Inhibition of voltage-gated calcium channels by fluoxetine in rat hippocampal pyramidal cells,” *Neuropharmacology*, vol. 39, no. 6, pp. 1029-1036, 2000.
- [67] A. Serafeim, M. J. Holder, G. Grafton, A. Chamba, M. T. Drayson, Q. T. Luong, C. M. Bunce, C. D. Gregory, N. M. Barnes ve J. Gordon, “Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells,” *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 3212-3219, 2003.
- [68] E. Nahon, A. Israelson, S. Abu-Hamad ve V. Shoshan-Barmatz, “Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death,” *FEBS Lett.*, vol. 579, no. 22, pp. 5105-5110, 2005.
- [69] S. Chan, “*Daphnia pulex* culture, protein extraction optimization, and ATPase and caspase 3/7 analyses after 1-Nitronaphthalene, 3,4,4'-Trichlorocarbaniide and Irgasan exposures,” Yüksek Lisans Tezi, University of California, Davis, 2010.
- [70] F. Zeroual, M. Guerbet, G. Nguyen- Ba ve J. Jouany, “Effects of cadmium and chlordane on cellular apoptosis in ecotoxicological test species,” *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 81, no. 3-4, pp. 153-160, 2001.
- [71] B. C. Seda, P. C. Ke, A. S. Mount ve S. J. Klaine, “Toxicity of aqueous C 70-

- gallic acid suspension in *Daphnia magna*,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, no. 1, pp. 215-220, 2012.
- [72] ASTM International, “Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians,” West Conshohocken, PA, USA, E 729 – 96, 2002.
- [73] OECD/OCDE, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems*. OECD Library, 2004.
- [74] US Environmental Protection Agency, “US EPA: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms,” *Environ. Prot.*, 2002.
- [75] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation ve W. E. Federation, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,” *Stand. Methods*, 1999.
- [76] T. Haap, R. Triebkorn ve H. R. Köhler, “Acute effects of diclofenac and DMSO to *Daphnia magna*: Immobilisation and hsp70-induction,” *Chemosphere*, vol. 73, no. 3, pp. 353-359, 2008.
- [77] E. Beutler, *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, 2nd ed. New York: Grune and Starton, 1984.
- [78] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres ve R. M. Featherstone, “A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88–95, 1961.
- [79] E. D. Wills, “Mechanism of lipoperoxide formation in animal tissues,” *Biochem. J.*, vol. 99, no. 3, pp. 667–676, 1966.
- [80] C. M. Stoscheck, “Quantitation of protein,” *Methods Enzymol.*, vol. 182, pp. 50-68, 1990.
- [81] X. Zhu, Y. Chang ve Y. Chen, “Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub> nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*,” *Chemosphere*, vol. 78, no. 3, pp. 209-215, 2010.
- [82] K. Sümbüloğlu ve V. Sümbüloğlu, *Biyoistatistik*, 17th ed. Hatiboğlu Yayıncılık, 2016.
- [83] J. P. Seiler, “Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology - Can the two be connected?,” *Toxicol. Lett.*, vol. 131, no. 1-2, pp. 105-115, 2002.
- [84] G. J. Della Rocca, Y. V., Mukhin, M. N. Garnovskaya, Y. Daaka, G. J. Clark, L. M. Luttrell, R. J. Lefkowitz ve J. R. Raymond, “Serotonin 5-HT(1A) receptor-mediated Erk activation requires calcium/calmodulin-dependent receptor endocytosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 8, pp. 4749-4753, 1999.
- [85] L. Bertrand, M. V. Monferrán, C. Mouneyrac, R. I. Bonansea, R. Asis ve M. V. Amé, “Sensitive biomarker responses of the shrimp *Palaemonetes argentinus* exposed to chlorpyrifos at environmental concentrations: Roles of alpha-tocopherol and metallothioneins,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 179, pp. 72-81, 2016.
- [86] T. C. Müller, J. B. T. Rocha, V. M. Morsch, R. T. Neis ve M. R. C. Schetinger, “Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1587, no. 1, pp. 92-98, 2002.
- [87] A. Jemec, D. Drobne, T. Tišler, P. Trebše, M. Roš ve K. Sepčić, “The

- applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test,” *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 144, no. 4, pp. 303-309, 2007.
- [88] S. Li ve Y. Tan, “Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos,” *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 23, no. 5, pp. 852-859, 2011.
- [89] X.-J. Zhang ve D. S. Greenberg, “Acetylcholinesterase involvement in apoptosis,” *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 5, article 40, 2012.
- [90] J. I. Goldberg, L. R. Mills ve S. B. Kater, “Effects of serotonin on intracellular calcium in embryonic and adult *Helisoma* neurons,” *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 10, no. 4, pp. 255–264, 1992.
- [91] R. L. Cooper, J. L. Winslow, C. K. Govind ve H. L. Atwood, “Synaptic structural complexity as a factor enhancing probability of calcium-mediated transmitter release,” *J. Neurophysiol.*, vol. 75, no. 6, pp. 2451-2466, 1996.
- [92] L. K. Simmons ve J. Koester, “Serotonin enhances the excitatory acetylcholine response in the RB cell cluster of *Aplysia californica*,” *J. Neurosci.*, vol. 6, no. 3, pp. 774-781, 1986.
- [93] O. Kiehn ve R. M. Harris-Warrick, “Serotonergic stretch receptors induce plateau properties in a crustacean motor neuron by a dual-conductance mechanism,” *J. Neurophysiol.*, vol. 68, no. 2, pp. 485-495, 1992.
- [94] M. Yardimci, Y. Sevgiler, E. Rencuzogullari, M. Arslan, M. Buyukleyla ve M. Yilmaz, “Sex-, tissue-, and exposure duration-dependent effects of imidacloprid modulated by piperonyl butoxide and menadione in rats. Part I: Oxidative and neurotoxic potentials,” *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, vol. 65, no. 4, 2014.
- [95] Z. P. Yang ve W. D. Dettbarn, “Diisopropylphosphorofluoridate-induced cholinergic hyperactivity and lipid peroxidation,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 138, no. 1, pp. 48-53, 1996.
- [96] P. A. Johnston, “Morphological changes in *Daphnia magna* (Straus) exposed to inorganic selenium as sodium selenate,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 14, no. 2, pp. 95-107, 1989.
- [97] C. M. Zhao ve W. X. Wang, “Regulation of sodium and calcium in *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 32, no. 4, pp. 913-919, 2013.
- [98] W. Paschen, “Role of calcium in neuronal cell injury: Which subcellular compartment is involved?,” *Brain Res. Bull.*, vol. 53, no. 4, pp. 409–413, 2000.
- [99] D. Milatovic, R. C. Gupta ve M. Aschner, “Anticholinesterase toxicity and oxidative stress,” *Sci. World J.*, vol. 6, pp. 295–310, 2006.
- [100] S. C. Bondy ve C. P. LeBel, “The relationship between excitotoxicity and oxidative stress in the central nervous system,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 14, no. 6, pp. 633–642, 1993.
- [101] C. Barata, I. Varo, J. C. Navarro, S. Arun ve C. Porte, “Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds,” *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 140, no. 2, pp. 175-186, 2005.

- [102] L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, H. Islas-Flores, S. García-Medina ve N. SanJuan-Reyes, "DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 164, pp. 21-26, 2014.
- [103] E. Gottlieb, S. M. Armour, M. H. Harris ve C. B. Thompson, "Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis," *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 6, pp. 709-717, 2003.
- [104] E. Sancho, M. J. Villarroel, E. Andreu ve M. D. Ferrando, "Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole," *Chemosphere*, vol. 74, no. 9, pp. 1171-1178, 2009.
- [105] M. J. Villarroel, E. Sancho, E. Andreu-Moliner ve M. D. Ferrando, "Biochemical stress response in tetradifon exposed *Daphnia magna* and its relationship to individual growth and reproduction," *Sci. Total Environ.*, vol. 407, no. 21, pp. 5537-5542, 2009.
- [106] M. Reddy Narra, R. Reddy Regatte ve R. Kodimiyala, "Influence of chlorpyrifos stress on protein metabolism of edible crab *Barytelphusa guerini*, and its recovery," *J. Stress Physiol. Biochem.*, vol. 9, no. 2, pp. 219-231, 2013.
- [107] D. Han, E. Williams ve E. Cadenas, "Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space," *Biochem. J.*, vol. 353, no. Pt 2, pp. 411-416, 2001.
- [108] J. Mehlhase ve T. Grune, "Proteolytic response to oxidative stress in mammalian cells," *Biol. Chem.*, vol. 383, no. 3-4, pp. 559-567, 2002.
- [109] T. Jung, A. Höhn ve T. Grune, "The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation," *Redox Biology*, vol. 2, pp. 99-104, 2014.
- [110] L. D. Zorova, V. A. Popkov, E. Y. Plotnikov, D. N. Silachev, I. B. Pevzner, S. S. Jankauskas, V. A. Babenko, S. D. Zorov, A. V. Balakireva, M. Juhaszova, S. J. Sollott ve D. B. Zorov, "Mitochondrial membrane potential," *Anal. Biochem.*, vol. 552, pp. 50-59, 2018.
- [111] L. Sonakowska, A. Włodarczyk, G. Wilczek, P. Wilczek, S. Student ve M. M. Rost-Roszkowska, "Cell death in the epithelia of the intestine and hepatopancreas in *Neocaridina heteropoda* (Crustacea, Malacostraca)," *PLoS One*, vol. 11, no. 2, pp. e0147582, 2016.
- [112] W. Abdel-Razaq, D. A. Kendall ve T. E. Bates, "The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria," *Neurochem. Res.*, vol. 36, no. 2, pp. 327-338, 2011.
- [113] X. Y. Chen, J. Z. Shao, L. X. Xiang ve X. M. Liu, "Involvement of apoptosis in malathion-induced cytotoxicity in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 142, no. 1-2, pp. 36-45, 2006.
- [114] M. M. H. Lauer, C. B. De Oliveira, N. L. I. Yano ve A. Bianchini, "Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 156, no. 3-4, pp. 140-147, 2012.
- [115] V. P. Skulachev, "Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades,"



- FEBS Lett.*, vol. 423, no. 3, pp. 275-280, 1998.
- [116] M. A. Menze, K. Hutchinson, S. M. Laborde ve S. C. Hand, "Mitochondrial permeability transition in the crustacean *Artemia franciscana*: absence of a calcium-regulated pore in the face of profound calcium storage," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 289, no. 1, pp. R68-R76, 2005.
- [117] C. Konrad, "Investigation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -inducible mitochondrial permeability transition pore and Bongkrekate sensitivity in distantly related animal species," Doktora Tezi, Semmelweis University, 2014.
- [118] M. A. Menze ve S. C. Hand, "Caspase activity during cell stasis: avoidance of apoptosis in an invertebrate extremophile, *Artemia franciscana*," *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 292, no. 5, pp. R2039-R2047, 2007.
- [119] I. M. Sokolova, "Cadmium-induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition," *J. Exp. Biol.*, vol. 207, no. Pt 19, pp. 3369-3380, 2004.
- [120] W. Y. Hu ve C. L. Yao, "Molecular and immune response characterizations of a novel AIF and cytochrome c in *Litopenaeus vannamei* defending against WSSV infection," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 56, pp. 84-95, 2016.
- [121] D. Liu, J. Yang, Y. Li, M. Zhang ve L. Wang, "Cd-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, pp. e68770, 2013.
- [122] L. L. D. Oliveira, S. C. Antunes, F. Gonçalves, O. Rocha ve B. Nunes, "Evaluation of ecotoxicological effects of drugs on *Daphnia magna* using different enzymatic biomarkers," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 119, pp. 123-131, 2015.
- [123] G. Nowak, G. L. Clifton, M. L. Godwin ve D. Bakajsova, "Activation of ERK1/2 pathway mediates oxidant-induced decreases in mitochondrial function in renal cells," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 291, no. 4, pp. F840-F855, 2006.
- [124] L. Canesi, L. C. Lorusso, C. Ciacci, M. Betti ve G. Gallo, "Effects of the brominated flame retardant tetrabromobisphenol-A (TBBPA) on cell signaling and function of *Mytilus* hemocytes: Involvement of MAP kinases and protein kinase C," *Aquat. Toxicol.*, vol. 75, no. 3, pp. 277-287, 2005.
- [125] H. Devaraj ve A. Natarajan, "Molecular mechanisms regulating molting in a crustacean," *FEBS J.*, vol. 273, no. 4, pp. 839-846, 2006.
- [126] W. J. Sun, M. Zhu, Y. L. Wang, Q. Li, H. D. Yang, Z. L. Duan, L. He ve Q. Wang, "ERK is involved in the process of acrosome reaction *in vitro* of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*," *Mar. Biotechnol.*, vol. 17, no. 3, pp. 305-316, 2015.
- [127] H. Devaraj, M. Saravanakumar ve M. Thiyagu, "Induction of ovarian maturation in *Penaeus monodon* by molecular signal interventional approach," *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.*, vol. 318, no. 7, pp. 572-585, 2012.
- [128] A.-R. Mun, S.-J. Lee, G.-B. Kim, H.-S. Kang, J.-S. Kim ve S.-J. Kim, "Fluoxetine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 3691-3697, 2013.
- [129] T. Vandenbrouck, A. Soetaert, K. van der Ven, R. Blust ve W. De Coen, "Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: Molecular

- fingerprints and (sub)organismal effects,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 92, no. 1, pp. 18-29, 2009.
- [130] M. Kavaliers ve E. Choleris, “Antipredator responses and defensive behavior: Ecological and ethological approaches for the neurosciences,” *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 25, no. 7-8, pp. 577-586, 2001.
- [131] A. W. Olmstead ve G. A. LeBlanc, “Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 19, no. 8, pp. 2107-2113, 2000.
- [132] M. Cuhra, T. Traavik ve T. Bøhn, “Clone- and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*,” *Ecotoxicology*, vol. 22, no. 2, pp. 251-262, 2013.
- [133] G. A. Papchenkova, I. L. Golovanova ve N. V. Ushakova, “The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generations affected by Roundup herbicide,” *Inl. Water Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. 286-291, 2009.
- [134] A. L. Flickinger, R. J. F. Bruins, R. W. Winner ve J. H. Skillings, “Filtration and phototactic behavior as indices of chronic copper stress in *Daphnia magna* Straus,” *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 11, no. 4, pp. 457-463, 1982.
- [135] B. Campos, C. Rivetti, T. Kress, C. Barata ve H. Dirksen, “Depressing antidepressant: Fluoxetine affects serotonin neurons causing adverse reproductive responses in *Daphnia magna*,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 50, no. 11, pp. 6000-6007, 2016.
- [136] C. O. Knowles, M. J. McKee ve D. U. Palawski, “Chronic effects of DI- 2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of *Daphnia magna*,” *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 6, no. 3, pp. 201-208, 1987.
- [137] C. Sánchez ve J. Hyttel, “Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 19, no. 4, pp. 467-489, 1999.
- [138] J. Asselman, D. I. De Coninck, S. Glaholt, J. K. Colbourne, C. R. Janssen, J. R. Shaw ve K. A. De Schamphelaere, “Identification of pathways, gene networks, and paralogous gene families in *Daphnia pulex* responding to exposure to the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, no. 15, pp. 8448-8457, 2012.

**KİŞİSEL BİLGİLER**

Adı Soyadı : Sevgi BAŞALAN  
Doğum Yeri : Adana  
Doğum Tarihi : 06/02/1987  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : igvesbsln@gmail.com

**Eğitim Durumu**

| Derece        | Alan     | Üniversite          | Mezuniyet Yılı |
|---------------|----------|---------------------|----------------|
| Yüksek Lisans | Biyoloji | Adıyaman            | -              |
| Lisans        | Biyoloji | Adıyaman            | 2015           |
| Lise          |          | Mehmet Kemal Tuncel | 2005           |

**Yayınlar**