

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MAYIS, 2017

YÜKSEK LİSANS-BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

ERCAN

KLORPRİFOS-ETİL’İN *Cyprinus carpio* (L.1758)’DA
TOTAL OKSİDAN/TOTAL ANTİOKSİDAN
SEVİYELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERCAN AYATA

MAYIS, 2017

**Klorprifos-etil'in *Cyprinus carpio* (L.1758)'da Total
Oksidan/Total Antioksidan Seviyelerine Etkisinin
Araştırılması**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Doç. Dr. Murat KÜTÜK

Yrd. Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ

ERCAN AYATA

MAYIS, 2017



© 2017 [ERCAN AYATA].

T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Klorprifos-etil'in *Cyprinus carpio* (L.1758)'da TotalOksidan/Total
Antioksidan Seviyelerine Etkisinin Araştırılması

Öğrencinin, Adı Soyadı: ERCAN AYATA

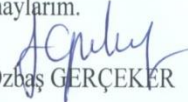
Tez Savunma Tarihi: 17.05.2017

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Filiz Özbaş GERÇEKER

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi
olarak kabul edilmiştir.

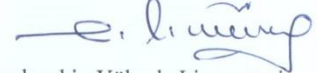
Yard. Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ

Doç. Dr. Murat KÜTÜK

2. Tez Danışmanı

Tez Danışmanı





Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi
olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvanı, ADI ve SOYADI):

İmzası

Prof. Dr. İhsan KARABULUT



Doç. Dr. Murat KÜTÜK



Yard. Doç. Dr. Gökhan NUR



İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

ERCAN AYATA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS-ETHYL ON TOTAL OXIDANT/TOTAL ANTIOXIDANT STATUS in *Cyprinus carpio* (L. 1758)

AYATA, Ercan

M.Sc. in Biology

Supervisor: Doç. Dr. Murat KÜTÜK

May 2017

51 Pages

In this study the determination of plasma total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) on *Cyprinus carpio* that applied different doses of chlorpyrifos-ethylis aimed. In this study 30 *Cyprinus carpio* (L. 1758) held from Tahtaköprü Dam were used. The adaptation of the fishes to new polyethylene tank environment (22-25 ° C and normal photoperiod) containing 1g/L water for 10 days after the transportation to the laboratory was provided. Then, the fishes were divided in to 3 groups that each includes 10 fishes as control, 0.040 mg/L CPF I and 0.080 mg/L CPF II. After 14 days application period blood samples were taken from the fishes and plasmas were separated. TOS/TAS statuses were analyzed in plasma samples. When the biochemical parameters of the blood samples obtained from the fishes that added 0.040 and 0.080 mg/L CPF to their life environment and the fishes found in control group were considered, it has been found that TOS levels are significantly increased ($p<0.001$) in CPF groups (0.040 and 0.080 mg/L) compared to the control, however TAS levels are decreased significantly ($p<0.001$). It has been determined that PON1 activity and HDL levels ($p<0.001$) were significantly decreased in other groups (CPF I ile CPF II) compared with control. The increment of TOS levels depend on increased doses, decrement of PON1, HDL, TAS levels give rise to thought that CPF increases oxidative stress that cause the increase of reactive oxygen forms and weaken antioxidant system in fishes.

Keywords: Total Oxidant Status, Total Antioxidant Status, *Cyprinus carpio*, Chlorpyrifos - ethyl, Paraoksonaz, High Density Lipoprotein.

ÖZET

KLORPRİFOS-ETİL'İN *Cyprinus carpio* (L. 1758)'DA TOTAL OKSİDAN/TOTAL ANTİOKSİDAN SEVİYELERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

AYATA, Ercan
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Murat KÜTÜK
Mayıs 2017
51 Sayfa

Bu çalışmada farklı dozlarda klorprifos-etil uygulanan *Cyprinus carpio* 'dan alınan kan plazmasında, total oksidan (TOS) ve total antioksidan (TAS) seviyelerinin belirlenmesi amaçlandı. Bu çalışmada Tahtaköprü Barajı'ndan tutulan 30 adet *Cyprinus carpio* (L. 1758) kullanıldı. Balıkların laboratuvara nakli sağlanarak 10 gün boyunca balıkların 1 g/L olacak şekilde su bulunan polietilen tanklarda (22-25 °C ve normal fotoperyod) yeni ortama adaptasyonları sağlandı. Daha sonra her grupta 10 adet olacak şekilde balıklar; kontrol grubu, 0.040 mg/L CPF I grubu ve 0.080 mg/L CPF II grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 14 günlük uygulama sonunda balıklardan kan örnekleri alındı ve plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma örneklerinde TOS/TAS seviyeleri analiz edildi. Yaşam ortamlarına 0.040 ve 0.080 mg/L CPF uygulanan balıklar ile CPF uygulanmayan kontrol grubu balıklardan 14 günlük süre sonrası alınan kan örneklerinde biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla CPF gruplarında (0.040 ve 0.080 mg/L) TOS düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği ($p<0.001$), buna karşın TAS ise önemli seviye de azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. PON1 aktivitesi ve HDL seviyeleri ($p<0.001$) için kontrol grubuna göre diğer gruplarda (CPFI ile CPFII) azaldığı tespit edilmiştir. Artan dozlara bağlı olarak TOS'un artması, PON1, HDL, TAS seviyelerinin ise azalması balıklarda CPF'nin reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan sistemi zayıflattığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Total Oksidan Seviye, Total Antioksidan Seviye, *Cyprinus carpio*, Klorprifos-etil, Paraoksonaz, Yüksek Dansiteli Lipoprotein.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ve fikirleriyle beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Murat KÜTÜK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgileriyle bana yardımcı olan ve her türlü desteği sağlayan, Yrd. Doç. Dr. Hacı Ahmet DEVECİ ve istatistiksel hesaplamalar konusunda bilgilerini benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Gökhan NUR'a teşekkür ederim.

Ayrıca yüksek lisans dönemi boyunca yardımlarını esirgemeyen, Yrd. Doç. Dr. Mehmet YARAN, Öğr. Gör. Vedat GÖRMEZ, Öğr. Gör. Muhammed Murat KANKAYA, Öğr. Gör. İbrahim Halil KORKMAZ Hocalarıma ve Biyolog Ruşen AVŞAR'a,

Maddi ve manevi alanda desteğini eksik etmeyen her zaman yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	i
ÖZET.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ.....	viii
SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ	ix
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1.Pestisitler.....	2
1.1.1.Tanım ve Sınıflandırma.....	2
1.1.2. İnsektisitler.....	5
1.1.2.1.Organofosforlu İnsektisitler.....	6
1.1.2.1.a. Organofosforlu İnsektisitlerin Etki mekanizması ve Detoksifikasyonu.....	7
1.1.3. Klorprifos-Etil.....	8
1.1.3.1. Klorprifosun oksidatif hasarı.....	10
1.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDAN SİSTEM.....	11
1.2.1. Serbest Radikaller.....	11
1.2.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu.....	13
1.2.2. Antioksidan Sistem.....	14
1.2.2.1. Paraoksonaz Enzimi (PON).....	18
1.2.2.2. Paraoksonaz ve HDL ilişkisi.....	20
1.2.2.3. Paraoksonazın Organofosforlu insektisit Detoksifikasyonu.....	21
BÖLÜM 2.....	22
KAYNAK ÖZETLERİ.....	22

BÖLÜM 3.....	25
MATERYAL VE METOT.....	25
3.1 Materyal	25
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	25
3.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.2.3. Biyokimyasal Ölçümler.....	26
3.2.3.1. Plazma Total Antioksidan ve Total Oksidan Seviye	26
3.2.3.1.a. Total Antioksidan Seviye	26
3.2.3.1.b. Total Oksidan Seviye	27
3.2.3.2 Plazma Paraoksonaz Aktivite Ölçümü.....	29
3.2.3.3 Plazma HDL Ölçümü.....	30
3.2.4. İstatistiksel Hesaplamalar.....	30
BÖLÜM 4.....	31
BULGULAR.....	31
4.1. Biyokimyasal parametreler.....	31
4.1.1. Plazma Total Antioksidan Seviyeleri.....	32
4.1.2. Plazma Total Oksidan Seviyeleri.....	32
4.1.3 Plazma Paraoksonaz (PON1) aktivitesi.....	33
4.1.4. Plazma HDL Seviyeleri.....	34
BÖLÜM 5.....	35
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
KAYNAKLAR.....	41

TABLÖLAR LİSTESİ

SAYFA

Tablo 1.1. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	5
Tablo 1.2. Klorprifos'un kimyasal Özellikleri.....	8
Tablo 1.3. Reaktif oksijen türleri.....	12
Tablo 1.4. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma sistemi.....	16
Tablo 3.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)	27
Tablo 3.2.Total Oksidan Seviye (TOS)	28
Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarına ait TAS/TOS, PON1 ve HDL seviyeleri.....	31

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil.1.1. Pestisitlerin biyolojik birikimi.....	4
Şekil.1.2. Organofosforluların genel formülü.....	6
Şekil.1.3. Klorprifos'un kimyasal formülü.....	9
Şekil .1.4. Paraoksonaz enziminin yapısı.....	19
Şekil.1.5. PON1'in üç boyutlu yapısı.....	19
Şekil.1.6. Paraoksonaz enziminin hücreden HDL'ye transferi.....	20

GRAFİKLER DİZİNİ

SAYFA

Grafik 4.1.1. Deney grupları TAS sonuçları.....	32
Grafik 4.1.2. Deney grupları TOS sonuçları.....	33
Grafik 4.1.3. Deney grupları Paraoksonaz aktivitesi sonuçları.....	33
Grafik 4.1.4. Deney grupları HDL seviyesi sonuçları.....	34



SEMBOLLER ve KISALTMALAR LİSTESİ

CPF: Klorprifos-etil

CAT: Katalaz

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GST: Glutasyon transferaz

TEPP: Tetraetil prifosfat

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

DNA: Deoksiribonükleik asit

SOD: Süperoksitdismutaz

TAS: Total Antioksidan Seviye

TOS: Total Oksidan Seviye

TSA: Total Sialik Asit

PON: Paraoksonaz

HDL: Yüksek dansiteli Lipoprotein

MS: Multiple Skleroz

HSİ: Hepatosomatik indeks

GR: Glutasyon redüktaz

G6PD: Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz

CAPE: Kafeik Asit Fenetil Ester

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Su, yerkürede güneş enerjisi etkisi ile döngü içerisinde katı, sıvı ve gaz olmak üzere 3 halde bulunmaktadır. İnsanların neden olduğu endüstriyel, evsel ve tarımsal atıklar, jeolojik ayrışım, volkanik faaliyetler ve toprak erozyonu gibi doğal olaylarla toksik etkili maddelerin sucul ortamlara katılımını artırarak hidrolojik döngüdeki suyun kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerini, olumsuz yönde etkilemektedir. Suyun bipolar özelliği ve homojen yapısından dolayı, belirtilen kaynaklardan akuatik ortamlara katılan kirleticilerin, geniş alanlara yayılmasına neden olup yayılma bölgelerindeki sucul canlılara aynı düzeyde etki etmektedir (USEPA, 1986; Karaaytuğ, 2004).

Balıklar son yıllarda kimyasalların sucul ekosistemdeki toksik etkisinin belirlenmesinde biyobelirteç olarak tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra tarımda kullanılan bazı kimyasalların canlılar üzerindeki etki ve detoksifikasyon mekanizmalarının anlaşılması amacıyla kullanılan balıklar, elde edilen sonuçlar itibariyle bu maddelerin insanlarda da yapabileceği etkiler konusunda bize fikir vermektedir (Stegamen vd., 1991; Kaya vd., 2014).

Toprak, su ve hava kirliliği gün geçtikçe büyük ekolojik sorunlar haline gelmeye başlamıştır. Özellikle toprak kirliliğinin en önemli nedenlerinden biri pestisitlerdir. 20. yüzyılın başında Dünya nüfusunun artması ve teknoloji ile sanayide meydana gelen ilerlemeler neticesinde tarım sektöründe birim alandan alınan verimi arttırmaya yönelik yoğun uygulamalar görülmeye başlamıştır (Akman, 2004; Altıkat vd., 2009).

Tarım alanında daha fazla ürün elde etmek için kullanılan kimyasal maddeler, böceklerle mücadele de kullanılan bir kısım kimyasal zehirler yağmur suları ile toprak altına inerek su kaynaklarının kirlenmesine sebep olmaktadır. Taşınmalarla akarsulara karışmış bu kimyasallar akarsulardaki canlı yaşamının zorlaşmasına hatta sona ermesine neden olmaktadır (Güler ve Çobanoğlu, 1994).

Bu çalışma ile tarımsal aktivitelerde sıklıkla kullanılan ve sulama, yağmur suları, drenaj suları yollarıyla yer altı ve yüzeysel sulara taşınan bir insektisit olan klorprifos'un *Cyprinus carpio* (L.1758)'da TAS, TOS, PON1, HDL düzeylerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1 Pestisitler

1.1.1. Tanım ve Sınıflandırma

Pestisitler, hayvan veya insanlarda meydana gelebilecek hastalıkları barındıran gıdaların, tarımsal ürünlerin, ağaç ve ağaçlardan elde edilen ürünlerin veya hayvan yemlerinin işlenmesi, eldesi, depolanması, transferi ve/veya satışı esnasında bu uygulamalara olumsuz etkilerinin ve her türlü zararın engellenmesi, ortadan kaldırılması veya denetime alınması, maksatıyla tercih edilen kimyasal maddelerdir (FAO., 2002; Altıkat vd., 2009).

Pestisitler, tarımsal mücadele, araştırma ve uygulamalarında kullanılan ve bir çok çeşidi olan kimyasal maddelerdir. Zararlı canlıları durdurmak, kontrol etmek ya da bu canlıların zararını en aza indirmek amacıyla kullanılmaktadır. Pestisitler, bakteri ya da virüs gibi biyolojik ajan, kimyasal, dezenfektan, antimikrobik ya da herhangi bir araç olabilmektedir. Zararlı canlılar, insanlar için önemli gıdalara, çiftçilerin ürünlerine zarar veren, hastalık yayıcı böcekler, bitki patojenleri, yabani otlar, memeliler, kuşlar, balıklar, solucanlar, yumuşakçalar ve mikroorganizmalarda olabilmektedir. Pestisitlerin kullanılmasının amacı çoğunlukla yarar sağlamak olsa da insanlar ve diğer canlılar için meydana getirdikleri toksik etkilerinden dolayı sorunlar meydana getirmektedir (MEB, 2012).

Pestisitlerle ilgili olarak çok eski tarihlerde kullanıldığına dair izlere rastlanmaktadır. M.Ö. 1500'lerde bulunan bir papirüste eşek arıları, pire ve bitlere karşı mücadele de insektisitlerin hazırlanışını gösteren kanıtlar bulunmuştur (Miller, 2002, Altıkat vd., 2009).

Pestisitler ilk olarak 1948 yılında insanlar üzerinde pestisit kalıntılarına rastlanması ile önem kazanmıştır. Pestisitlerin bir kısmı zehirlilik açısından zarar meydana getirmezken, bir kısmının ise kansere neden olabildiği, sinir sistemi üzerinde

nörotoksik etkili olduğu belirlenmiştir. Pestisit bulaşıklarının etkili olduğu en önemli kaynaklardan biri de gıdalardır (Akman vd., 2004, Altıkat vd., 2009).

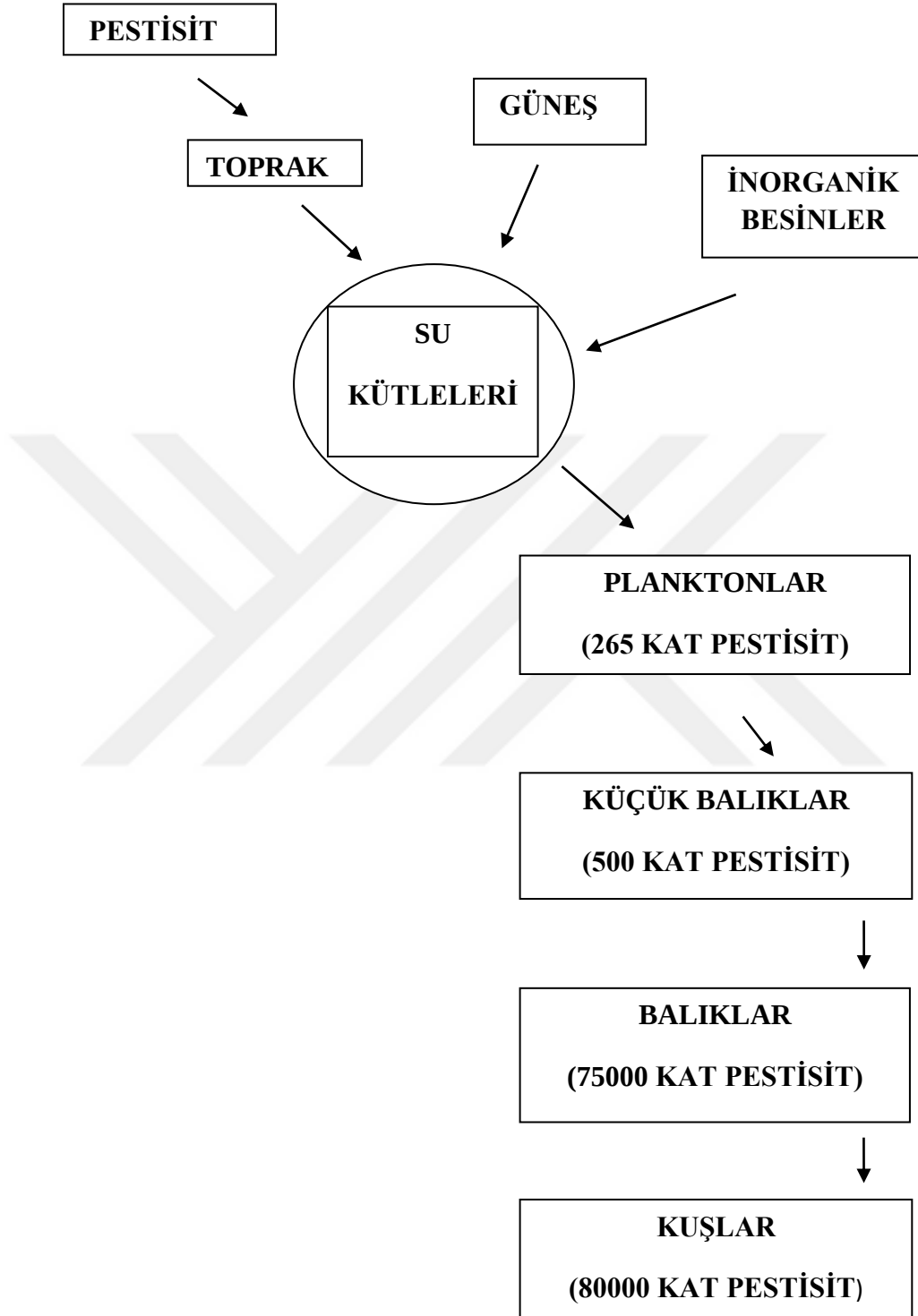
Teknolojinin ve bilimin gelişmesiyle meydana gelen değışik faaliyetler, yöntemler ve bunların sonuçları gün geçtikçe doğaya zarar verici bir nitelik kazanmaya başlamıştır. Başka bir yandan insan aktivitesi sonucu meydana gelen kirlilik ve bozulmalar, tarımsal ürün kalitesini de etkilemekte, bu karşılıklı etkileşmeler tarım-çevre ilişkilerinde de önemli bir sorun haline gelmektedir (Çiftçioğlu ve Issa, 2006).

Türkiye’de yerleşim yerlerinin çoğunluğu içme sularını kuyu ve sondajlardan sağlamaktadır. Yeraltı suyunun kirliliğı bu yüzden insanlar açısından önem arz etmektedir. Sulardaki pestisit kalıntıları genel olarak çözünmez, süspansiyon halde organik maddelerde, çamurda, çürüme kalıntılarında ve planktonlara tutunarak kalır. Besin zincirine bu yolla girerek, balıklarda, sucul ortamda bulunan omurgasız canlılarda çok kolay birikebilirler. Sucul ortamda planktonlar ve bakterilerde biriken insektisit kalıntıları, besin zincirinde birikerek balıklara kadar bu yolla ulaşır; balıklarda bu birikim en yoğun seviye de olur. Balıklarla besin olarak kullanan organizmalarda ise bu birikim en yoğun seviyelere ulaşır. Balık yavruları ise kimyasallara ve ilaçlara karşı çok duyarlı ve narindir. Bu nedenle balık türlerinin hayat döngüsünde bu durumda canlı kalabilme gücünü gösteremediğinden pestisitlerin ve ilaçların zararlı etkisi bu organizmaların sayılarını daha da azaltmaktadır (Altıkat vd., 2009, Öden, 2009).

Özellikle son yıllarda su kütlelerine artan oranlarda pestisitler ve fabrika atıkları karışmaktadır. Pestisit ve atıklar; su, sediment, suda asılı partikül ve beslenme yoluyla akuatik organizmalar tarafından bünyelerine alınmaktadır. Organizmalar tarafından kendi yapılarına aldıkları çevre kirletici maddeler, reaktif oksijen türleri ile mücadelede görev alan metabolik aşamaları alt üst edebilirler (Halliwell ve Gutteridge., 1989, Akbulut vd., 2014).

3000 yıldır kullanılan pestisitlerin yaygınlaşması esas olarak 1940’lardan itibaren olmuştur. Bu tarihten sonra etkinlikleri daha çok artmıştır. Ancak, zararlı canlılara karşı kullanılan pestisitlerin diğeryandan yararlı arthropodları da olumsuz etkilediğı, bu durumun özellikle zararlı böcekler ile yapılan biyolojik savaşa engel olduğu

gerçeği insanları çevreye dost mücadele metotlarına yönelmeye itmiştir (Romoser ve Stoffolano, 1994; Akkuzu vd., 2001).



Şekil.1.1. Pestisitlerin biyolojik birikimi (Biyokonsantrasyon) (Eaton vd., 1986).

Pestisitlerin, kullanıldıkları zararlı canlı grubuna göre sınıflandırması aşağıdaki Tablo 1.1'deki gibi yapılmaktadır (Yanık ve Atamanalp, 2001; Alak vd., 2011).

Tablo 1. 1. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitlerin Sınıflandırılması	
1. Böcek öldürücü	(İnsektisit)
2. Yabancı ot öldürücü	(Herbisit)
3. Örümcek öldürücü	(Akarisit)
4. Bakteri öldürücü	(Bakterisit)
5. Yaprak biti öldürücü	(Afisit)
6. Kemirgen öldürücü	(Rodentisit)
7. Nematod öldürücü	(Nematosit)
8. Yumuşakça öldürücü	(Mollussisit)

1.1.2 İnsektisitler

Zararlı böceklerle mücadelede dört temel insektisit grubu yaygın olarak tercih edilmektedir (Alak vd., 2011). Bunlar;

(a) Organik Fosforlular

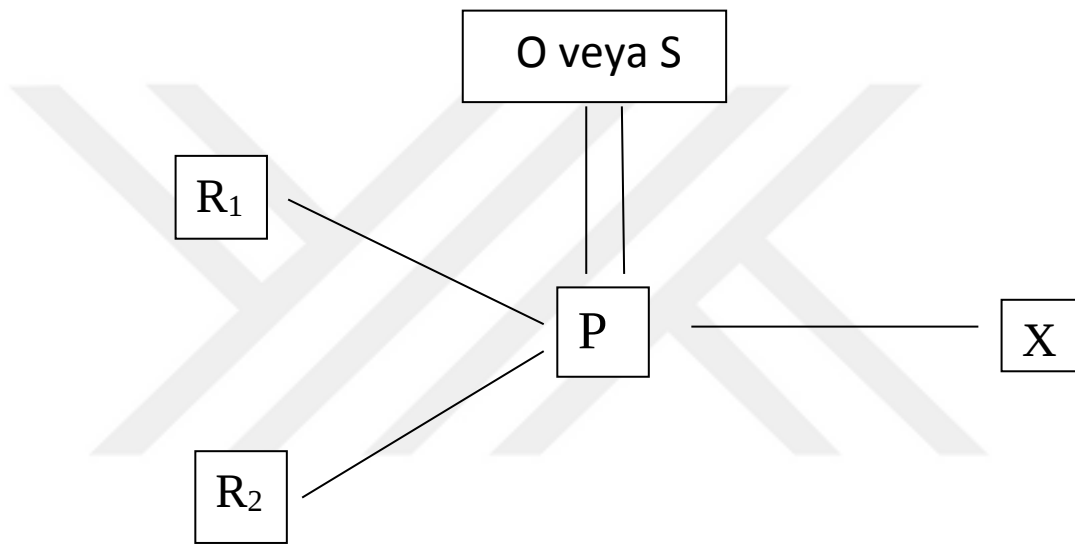
(b) Piretroidler,

(c) Karbamatlar ve

(d) Organoklorinler (Organik Klorlular) olarak gruplandırılabilir.

1.1.2.1 Organofosforlu İnsektisitler

Pestisitlerin günümüzde tercih edilen büyük bir bölümü organofosforlu, karbamatlı ve sentetik piretroidlerdir. Organofosforlu pestisitler, Almanya’da 1930’lu yıllarda kimyasal silah olarak savaşlarda kullanılmak üzere üretilmeye başlanmıştır. Yarı ömürlerinin kısa olmaları sebebiyle doğada hızlı bozulmalara neden olmuştur. Dünyada en yaygın olarak kullanılan insektisit grubunu meydana getirmiştir. Organofosforlu insektisitlerin genel formülü Şekil 1.2.’de verilmiştir (WHO, 2016).



Şekil.1.2. Organofosforlu insektisitlerin genel formülü (WHO, 2016).

Gerald Schrader öncülüğünde bir kısım kimyacı tarafından Almanya’da üretilen kimyasallar organofosforlu insektisitlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu kimyasalların önemli bir boyutta zehirliyeti etkisinin olduğu tespit edilmiş ve bu kimyasalların bir bölümü II. Dünya Savaşında Naziler tarafından kullanılmıştır. Etkili bir ajan olarak kullanılan ve sinir gazı adı verilen sarin ve tabun gazlarının sentezi gizli tutulmuştur. Sinir gazı denilen bu tür organofosforlu kimyasalların memeli canlılara olan toksik etkisi öğrenildikten sonra böcek öldürücü etkisinin de anlaşılması ile tetraetil pirofosfat (TEPP) üretimine başlanmıştır. Gerald Schrader sağlam bir yapıya sahip olan parathion ve oksijen analogu paraoksonu 1944 yılında üretmiştir. Organik yapıdaki pestisitlerin üretimi ve kullanımı II. Dünya Savaşı sonrasında sonra da önemli ölçüde artmaya başlamıştır (Vural, 1996).

Organofosfor grubu insektisitler Dünyada pestisit tüketiminin yaklaşık % 45'ini oluşturur. Sentezlenmelerinin kolaylığı organofosforlu kimyasalların çeşitlenmesini sağlamıştır. Grup içerisindeki etken maddelerin kalıcılık, suda çözünme, buharlaşma, sıcakkanlı canlılara yaptığı zehir etkileri gibi fizikokimyasal özellikleri dikkate değer farklılık gösterir. Bu sebepten dolayı hemen hemen her zararlı canlıya özel organik fosforlu bir etken madde bulunabilmesi söz konusudur. Organikfosforlu pestisitler deri, sindirim ve solunum yoluyla da etki ederler. Organikfosforlu pestisitlerin kalıcı olmasını ve etki mekanizmasını genellikle fosfor atomuna bağlanan kimyasal yapının özelliği belirler. Bu grupta oksidasyon ve hidroliz gibi kimyasal reaksiyonlardan büyük ölçüde etkilenmesi söz konusudur (MEB, 2012).

1.1.2.1.a Organofosforlu İnsektisitlerin Etki mekanizması ve Detoksifikasyonu

Su canlılar için yaşamın temeli olup, en önemli doğal kaynaklarımızdan biridir. Canlılar yaşamını sürdürmek için içilebilir suya gereksinim duymaktadır. İçilebilir su tarımsal üretim yapan kişilerce ürün sulama ve besi hayvanlarının su ihtiyacını gidermek için vazgeçilmez bir unsurdur. Dünyanın birincil içilebilir su kaynağı, yeraltı sularıdır. Bitki ve toprak uygulamaları sonrası, yüzeyde kalan pestisit kalıntıları, yağmur suyu, yüzeysel akış ile birlikte ya da toprak ile tabana doğru taşınmak suretiyle yeraltı sularına ve diğer kaynaklara kadar inebilmektedir. Arazi eğimi, formülasyon, bitki örtüsü, toprağın yapısı ve yağış durumuna bağlı olarak taşınan pestisitler su kaynaklarına ulaşabilirler. Pestisitler, su kaynaklarına karıştıktan sonra bile bozulmaları devam eder. Ancakışığın azlığı, sıcaklığın az olması ve oksijen sebebiyle daha az seviyede bozulurlar. Su kaynakları kirlendiğinde; kirli su akıntıları, çaylar ve derelerde de kirlilik meydana getirebilir. Kirlilik kaynakları engellenmiş dahi olsa bir jeolojik yapının kendi kendisini temizlemesi vakit alan bir durumdur. Su kaynakları kirlendiği zaman temizliği çok zordur ve pahalı bir işlemdir. Bu yöntemle diğer canlılar ve bitkilere kadar etki eden pestisitler, bu canlılarda kalıntılara ve zehir etkisine sebep olabilmektedir (Yücel, 2007; Altıkat vd., 2009).

Organofosforlu insektisitlerin etkileri, aktivasyonla sonlandığı gibi detoksifikasyon şeklinde de olabilmektedir. Detoksifikasyonları, B-esterazlar olarak bilinen butirilkolinesteraz, karboksilesteraz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin etkisiyle

gerçekleşen bağlanma reaksiyonlarını ve A-esteraz olarak da bilinen paraoksonaz enzimi aracılığıyla oluşan hidroliz reaksiyonları içine alır (Karelliedde, 2003; Demirdöğen, 2010; Özkaya vd., 2013).

Organofosforlu insektisitlerle ilgili önemli bir diğer konu karaciğerdeki aktivasyonlarıdır. Fosfatlardan (P=O) daha lipofilik olan fosfotiyotların (P=S) yağlı dokuda daha çok depolandığı bilinmektedir. Karaciğerdeki sitokrom P450 enzimi aracılığıyla oksidatif desülfürasyona uğrayan fosfotiyotları, etkinliği daha fazla olan fosfat formuna parçalar. Fosfotiyotlara maruz kalınması durumunda toksik semptomların başlaması zaman alır. Ancak bu insektisitlerin yağlı dokuda daha fazla depolanmaları sebebiyle eliminasyon da yavaş olur hatta günlerce, haftalarca sürebilir (Kwong, 2002; Costa, 2006; Özkaya vd., 2013).

1.1.3 Klorprifos – Etil

Tablo 1.2. Klorprifos'un kimyasal Özellikleri (Eaton, 2008).

Ampirik formül: C₉ H₁₁ Cl₃ NO₃ PS

Kimyasal ismi: O,O-diethyl O-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate

CAS Numarası: 2921-88-2

Buhar basıncı: 2.5 mPa 25 °C

Molekül ağırlığı: 350.57

Suda çözünürlüğü: 2 mg/L 25 °C

Erime noktası: 41-42°C

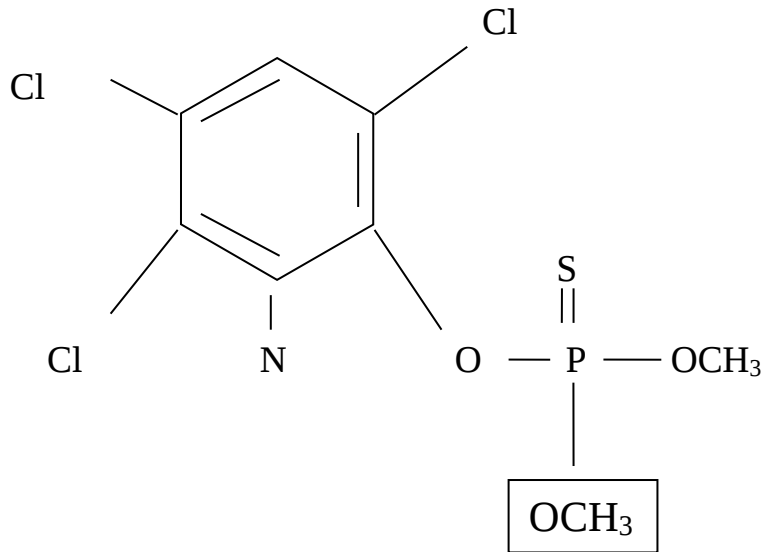
Yarılma ömrü: 12-41 gün
(suda)

Diğer solventlerde çözünürlüğü: Benzen, kloroform, aseton, dietilksilene, eter, metilen klorid, karbon disulfid, etanol, metanol.

Diğer isimleri: Dursban, Detmol UA, Brodan, Dowco 179, Prinex Empire, Lorsban, Eradeks, Paqant, Pridane, Priban 4, Stipend (Eaton 2008; Deveci, 2012).

Klorprifos [0,0-diethyl-0-(3,5,6-trichloro-2-pyridinyl) phosphorothioate], yeraltı suları ve yüzeysel sulara, yağmur suları, atmosferik çökeltme ve dökümlerle tarımsal sulama sonrası oluşan drenaj sularıyla taşınan, böcek öldürücü organofosfor grubunda böcek öldüren zirai bir ilaçtır. Avrupa Birliği Su Çerçeve Direktifinin (2008/105/EC) 33 adet “önemli tehlikeli maddeler” veya “önemli kirleticiler” listesi içerisinde bu kimyasal bulunmaktadır. Farklı ülkelerde su kaynaklarına yönelik yapılan çalışmaların sonuçlarına göre bu zirai ilaca olan ilginin gün geçtikçe artmakta olduğu ve sularda yoğun bir biçimde klorprifos kalıntılarının tespit edildiğini göstermiştir (Estevez, 2012; Ekmekyapar, 2014).

Klorprifos’un metaboliti, klorprifos-okson sinir kavşaklarında asetilkolinesterazı inhibe ederek önemli bir kolinerjik zehir etkisi meydana getirir. İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalarda, kronik ve akut organofosforlu insektisit uygulamalarının ardından ortaya çıkan zehir etkisinin (hepatotoksisite, nörotoksisite, immünotoksisite, genetik toksisite, embriyotoksisite gibi) patogeneğinde oksidatif doku hasarı oluşturduğu belirlenmiştir (Stephen, 1997, Dwivedi, 1998, Öncü vd., 2002).



Şekil.1.3. Klorprifos’un kimyasal formülü (Eaton, 2008)

Klorprifos'un en önemli zehir etkisini bileşiği olan klorprifos-okson oluşturmaktadır. Klorprifos, sitokrom p-450 tarafından metaboliti klorprifos-oksona dönüştürülmektedir. Bu bileşik karboksilesteraz, butirilkolinesteraz'da olduğu gibi asetilkolinesteraza yüksek ilgi ile bağlanarak ve asetilkolinesterazı inhibe ederek zehir etkisi yapmaktadır. Canlılarda organofosforlu insektisitlerin detoksifikasyonu, Paraoksonaz (PON1), asetilkolinesteraz ve karboksilesteraz gibi enzimlerle olmaktadır. PON1 enzimi, diazinon, parathion ve Klorprifos gibi çok sayıda insektisit zehir etkili okson metabolitlerini ve soman, tabun, sarin gibi organofosforlu sinir ajanlarını parçalayabilmektedir (Timchalk, 2007; Eaton, 2008; Deveci vd., 2015a).

1.1.3.1. Klorprifosun oksidatif hasarı

Organofosforlu insektisitler, yağ oranı yüksek dokulara olan ilgilerinden dolayı, lipofilik doku ve organlarda birikme durumundadır. CPF metabolitlerinin beyindeki lipofilik özelliği karaciğere göre daha fazla olduğu için beyinde birikme oranı daha yüksektir (Şavik, 2005; Deveci, 2012).

Oksijen elektron ilgisi nedeniyle oldukça reaktifliği yüksek bir moleküldür ve O₂'nin H₂O'ya redüksiyonu anında çok fazla reaktif ara metabolitler meydana getirmektedir. Bu yüzden organizmalarda oksidatif stresin zararlı etkilerini uzaklaştırabilmek için antioksidan savunma mekanizmaları oluşturulmuştur. Oksidatif stres tarafından indüklenen antioksidan enzimler önemli bileşenler olup, endojen enzimler Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon-S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistem, (Hidroperoksidaz) ve eksojen enzimlerden (Vitamin C ve E, bazı ilaçlar) meydana gelmektedir (Liedias, 1998; Oruç, 2004; Alak vd., 2011).

Organofosforlu insektisitler ya da etkin bileşenleri, asetilkolinesterazın etkin bölgesinde bulunan serinin hidroksil grubuna fosfat radikalleri ile kovalent bağlanır. Enzimin asetilkolin bağlanan esteratik bölgesine bu fosforilasyon sırasında dialkylfosfat grubu aktarılır. Fosfor ile hidroksil grubunun oluşturduğu kovalent bağ, yavaş bir şekilde su varlığında hidrolize uğrar. Kovalent bağ hidroliziyle enzim tekrar aktivite gösterir (reaktivasyon). İnsektisit yan zincir yapısına göre enzimin

reaktivasyon hızı değişiklik gösterebilir. Sülfür varlığında oksijene oranla reaktivasyon hızı yükselir (Moretto, 1998; Özkaya vd., 2013).

1.2. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDAN SİSTEM

1.2.1. Serbest Radikaller

Biyolojik mekanizmalarda en önemli serbest radikaller oksijenden oluşanlardır ve bunlara reaktif oksijen türleri (ROT) denilmektedir. ROT'lar, DNA, protein, lipidler ve tüm yapılardaki moleküllere savaş açar. DNA molekül oksidasyonu ile hücre bölünmesinin durması, genetik kontrolsüz büyüme, mDNA hasarı, lipid peroksidasyonu ile hücre membranında hasar meydana getirir (Cankurtaran, 2005; Atmaca, 2009; Ögüt ve Atay, 2012).

Pek çok akuatik canlı belirli reaktif oksijen türlerinin denetimli üretimi için özel dizayn edilmiş sistemlerden oluşur. Örnek olarak, siyanür duyarsız oksidatif bozulma, ilk kez lökositlerde tanımlanmış olup benzer uygulamalar, daha sonra hayvanlarda çoğu hücre tipinde ve bitki hücrelerinde de bulunduğu belirlenmiştir (Dri vd.,1979; Akbulut vd., 2014).

Balıklarda serbest radikallerin oluşumu enteresan bir şekilde hem insanlarda hem de diğer hayvanlardaki antioksidan mekanizmalarla çok örtüşmektedir. Canlı sistemlerde serbest radikal oluşumunun birçok sistemi bulunmaktadır. Çoğunlukla oksijen metabolizmasının yan ürünleri olarak oluşmaktadır (Papa ve Skulachev, 1997; Akbulut vd., 2014).

Canlılarda yaşamsal önemi olan biyokimyasal reaksiyon anında oksijen indirgenerek, reaktif oksijen türleri adı verilen ve çoğu doku ve hücrede oksidatif hasar oluşturan ara metabolitler oluşturmaktadır. Oksijenli solunum yapan organizmaların hayatlarını devam ettirebilmeleri için lazım olan bir molekül olarak toksikdir. ROT'lar neden oldukları oksidatif yıkımdan ötürü serbest radikal” veya “oksidan madde” “olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller, oksijenli solunum yapan bütün organizmalarda meydana gelmektedir. Canlıda oksidatif stres oluşturan önemli reaktif oksijen türleri aşağıda Tablo 1.3.'de verilmiştir (Cheeseman, 1993; Akkuş, 1995; Deveci, 2012).

Tablo 1.3. Reaktif oksijen türleri (Deveci, 2012)

NON-RADİKALLER	RADİKALLER
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Nitrik oksit radikali ($NO^{\bullet}$)
Hipokloröz asit ($HOCl$)	Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$)
Lipid hidroperoksit ($LOOH$)	Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$)
Singlet oksijen (1O_2)	Peroksil radikali ($ROO^{\bullet}$)
N-Halojenli aminler ($R-NH-X$)	Alkoksil radikali ($RO^{\bullet}$)
Peroksinitrit ($ONOO^-$)	Semikinon radikali ($HQ^{\bullet}$)
Azotdioksit (NO_2)	Hemoproteine bağlı radikaller
Ozon (O_3)	Organik radikaller ($R^{\bullet}$)

Oksidanlar tanım olarak bir veya birden çok eşlenmemiş elektrona bulunduran, kararsız, ömrü kısa, düşük molekül ağırlıklı ve çok aktif moleküllerdir. Çoğu olayda serbest radikal üretimi, patomekanizmanın bir parçasıdır. Pek çok ksenobiyotiğin zehir etkisi, serbest radikal üretimiyle alakalıdır. Kurşun ve kadmiyum gibi bazı kirleticilere uzun süreli olarak maruz kalmalar, oksidatif strese neden olabilir. Canlı organizmalarda istenmeyen etkilerin altında yatan bir mekanizma olması ile önemlidir (Mercan, 2004).

Yaşlılık ve hastalanma nedeni olan oksidan maddelerin canlı yapısında bulunması ve bunların zarar verici etkilerinin biyolojik sistemlerde bazı özel antioksidanlar ile kontrol altında tutulabilir olduğu yarım asrı aşan bir süredir farkında olunan bir

durumdur. Oksijen pek çok organizmada olduğu gibi sucul canlılar içinde hayatsal bir moleküldür. Oksijen, canlılar için hayati değere sahip olan bir molekül olmanın yanında çok tehlikeli zehir etkisi yapan formlara yani oksidan maddelere de dönüştüğü bilinmektedir (Harman, 1956; Akbulut vd., 2014).

Oksidanların zararlı etkilerine, çok sayıdaki hücre koruyucu enzimlerle karşı koyulur. Antioksidan enzimler ile radikal hasarı durdurulmaya çalışılır. Canlıda hücreysel antioksidan enzimler ve serbest radikallerin birbirleri arasında denge oluşturan bir ilişki vardır (Mercan, 2004).

Hücrede oksijenin kullanıldığı her kısımda, antioksidanlar, oksijenin ara metabolitlerini en aza indirmek için hızlı ve spesifik olarak çalışma eğilimindedir. Antioksidan savunma mekanizmasında etkili olanlar enzimatik antioksidanlar önceliklidir. Bunlar superoksitdismutaz (SOD), glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) gibi enzimler olduğu bilinmektedir (Ozan, 2004).

Meydana gelen oksidan maddeler, canlıların özel enzim sistemleri [süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)], lipid ve suda eriyebilen bazı protein yapıda olmayan moleküller (ürik asit ve a-tokoferol) benzeri antioksidanlar ile durdurulmaya çalışılmaktadır. Antioksidanlar az bir oranda, çok kolay oksitlenebilen maddelerin oksidasyonunu yüksek oranda geciktiren veya durduran maddeler olarak tarif edilmektedir (MackDonald-Wicks, 2006; Deveci, 2012,).

1.2.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu

Canlıda serbest radikal oluşturan doğal olayların başlıcaları şunlardır (Bejma, 1999; Zaobrnj, 2005; Ögüt ve Atay, 2012).

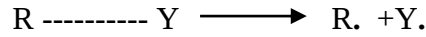
- a) Heksoz monofosfat yolu,
- b) Mitokondriyal elektron transportu,
- c) Doğal uyararla fagositik hücrelerin aktivasyonu,
- d) Ksenobiyotiklerin metabolizması,
- e) Biyokimyasal ve biyosentetik yıkım olaylarıdır.

Reaktif oksijen türleri üç şekilde oluşabilir:

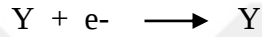
1. Bir molekülden bir elektronun ayrılması ile,



2. Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağı atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan homolitik bağ kırılmasıyla,



3- Bir moleküle bir atomun katılması ile olur.



Serbest radikaller, canlıda normal olarak meydana gelen biyokimyasal olaylarla oluştuğu gibi çeşitli dış kaynakların etkisiyle de oluşmaktadır. Bunlar şöyle: kimyasal enflamasyon, radyasyon yaralanması, mikroorganizmaların öldürülmesi (fagositoz), oksijen ve diğer gaz toksisiteleri, fotokimyasal maddeler ve yaşlanmadır (Tanove, 1998; Tulunoğlu, 1999).

1.2.2. Antioksidan Sistem

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellemek, bu maddelerin oluşturduğu hasarları engel olmak ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev alan savunma sistemleri “antioksidan savunma mekanizmaları” ya da “antioksidanlar” olarak isimlendirilmektedir. Antioksidanlar, radikallerle hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini engelleyen maddelerdir. Antioksidanların rolleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede yarar sağlamak olduğu söylenebilir (Dündar, 1999; Şener, 2009; Karabulut ve Gülay, 2016 a).

Antioksidan mekanizmaların en büyük özelliği, mekanizmanın tüm metabolitlerinin serbest radikaller üzerinde bir etki meydana getirecek şekilde işlemesidir. Bu sebeple antioksidanlar organizmada homeostazisin sağlanmasında hayati önemlilik taşır.

Kanda antioksidan ve oksidanların bir bölümünün birlikte etki etmesiyle her birinin tek tek meydana getirdiğinden daha fazla oksidan ve antioksidan etkinin ortaya çıktığı bilinmektedir (Erel, 2004, Kaya vd., 2014).

Akuatik canlılarda antioksidan mekanizmalar yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidanlar bulundurulur. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar, askorbik asit (C vitamini), glutatyon gibi suda çözünen ve α - tokoferol (E vitamini), karotenoid (β -karoten dahil) ve retinol (A vitamini) gibi yağda çözünen bileşiklerde belirlenmiştir. Bunlar genel olarak oksidan maddeleri ortamdan uzaklaştırmada büyük öneme sahiptir (Livingstone, 2001, Akbulut vd., 2014).

Antioksidanlarda, hücreleri radikal saldırısından sonra DNA'yı onarabilen hasara göre proteinleri yıkabilen ve lipid hidroperoksitleri metabolize edebilen mekanizmaları bulundurur. Antioksidan, okside edebilen bir substrata göre düşük konsantrasyonlarda bulunduğu o substratın oksidasyonu geciktiren veya engelleyen maddelerdir. Antioksidanlar oksidanların;

- Oluşumlarını önleyerek,
- Biyolojik olarak önemli reaktif oksijen türlerini temizleyerek,
- Yaptıkları hasarı onararak etki ederler (Datsenko, 1996, Şenses vd.,1999).

Antioksidanların önemli bir kesimini lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını kıran antioksidanlar oluşturmaktadır. Bunlar peroksi (ROO) ve alkoksi (RO) radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini engeller (Tulunoğlu, 1999).

Yapılarına göre antioksidanlar enzim olmayanlar antioksidanlar [vitamin C, vitamin E, vitamin A, redükte glutatyon (GSH), melatonin] ve enzim yapısında olan antioksidanlar [Glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksitdismutaz (SOD), Glutatyon-S-transferaz (GST), Katalaz (CAT)] ve şeklinde iki başlık altında toplanmaktadır. Hücrede bulunduğu bölgelere göre de intrasellüler antioksidanlar (CAT, GSH-Px, SOD), ekstrasellüler antioksidanlar (vitamin C, albumin, ürat,) ve membran antioksidanlar (vitamin A, vitamin E) olarak toplanmaktadır (Akkuş, 1995; Deveci, 2012).

Antioksidanların kararlı durum seviyeleri, ulaştırma, metabolizasyon, alım/sentez, atılım arasındaki denge ve etkisiz hale gelme ile sağlandığı bilinmektedir.

Organizmada üretimi yüksek seviyede olan karotenoid ve tokoferoller gibi bir takım antioksidanlar ile besin olarak akuatik canlılar tarafından alınmaktadır (Kelley ve ark., 2010, Akbulut vd., 2014).

Tablo 1.4. Biyolojik mekanizmalarda antioksidan savunma sistemi (Deveci, 2012).

Enzimatik antioksidanlar	Nonenzimatik Antioksidanlar	
Paraoksonaz (PON1)	α - Tokoferol (vit E)	Transferin
Süperoksit dismutaz (SOD)	Glutasyon (GSH)	Seruloplazmin
Katalaz (CAT)	Askorbik asit (vit C)	Ferritin
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	Flavonoidler	Melatonin
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	β -Karoten	Laktoferrin
Fosfolipid hidroperoksit	Ürat	Sisten
Glutasyon redüktaz (GR)	Albumin	Kafeik asit fenetilester (CAPE)
	Bilirubin	

Vücut sıvıları ve plazmada yer alan tüm antioksidanların total etkisi, TAS'ı belirlemektedir. Total antioksidan aktivite, Total antioksidan seviye, total antioksidan durum ve total antioksidan güç gibi isimlerle tanımlanmaktadır. Plazmada antioksidan maddelerin bir kısmının total etkisi nedeniyle bir enzimin tek tek oluşturduğu etkiden çok yüksek antioksidan etki oluşturmuştur (sinerjistik etki). İşte bu sebeple antioksidan-oksidan dengenin tespiti için antioksidanların tek tek

ölçülmesi yerine TAS'ın tespit edilmesinin çok faydalı olabileceği belirlenmiştir (Erel, 2004).

Antioksidan ve oksidan moleküllerin analizinde tercih edilen farklı metodlar bulunmaktadır. Canlıdaki antioksidan/oksidan dengenin tespiti için tek tek antioksidanların ve oksidanların analizi yerine, total oksidan kapasite (TOS) ve total antioksidan seviye (TAS) analizinin daha faydalı olduğu belirtilmektedir (Erel, 2004, Erel, 2005).

Plazma veya serumda antioksidanlardaki gibi farklı oksidan maddelerin ayrı ayrı analizinin kolay olmayışı ve bu oksidan maddelere birlikte etki etmesi her bir molekülün tek başına meydana getirdiği daha yüksek oksidan etki ortaya çıkarmasından dolayı TOS analizinin daha faydalı olduğu belirtilmektedir (Erel, 2005).

Antioksidan seviye analizine ilişkin geliştirilen metodlar vakit alan, sabır isteyen maddi açıdan pahalı ve günlük kullanımı mümkün olmayan ölçümlerdir. Fakat Erel'in (2004) geliştirdiği yeni TAS yöntemi çabuk, pratik, güvenli, ucuz, tam otomatik bir yöntem olup, veriler tekrar tekrar denenebilmektedir. Ayraçları uzun ömürlüdür. Kullanılan bu yöntem vitamin C, bilirubin, ürik asit, polifenoller ve proteinlerin antioksidan etki tespiti için çok uygundur. Bu yöntemde, bilirubin, EDTA, sitrat ve okzalot, hemoglobinin, analiz ile alakalı olmayıp ve TAS'ı analiz için yararlanılabilir (Erel, 2004).

Oksidan seviyeyi total analiz etmek için, değişik kolorimetrik yöntemler geliştirilmesine rağmen, bunlar ideal seviyeye ulaşamamıştır. Bu yöntemler analitik sorunları ve teknik kısıtlamaları beraberinde getirmektedir. Fakat Erel'in geliştirdiği yöntem oksidan seviyeyi total analiz için ideal bir metottur. Bu yöntem diğerlerine göre, çabuk, pratik, stabil, güvenli, daha ucuz ve duyarlıdır. Sonuç tekrarları çok iyi yapılabilir. Ayraç uygulaması basit ve ömürleri uzundur (Erel, 2005).

1.2.2.1. Paraoksonaz Enzimi (PON)

Kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olan paraoksonaz (PON), glikoprotein yapıda, hem paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) hem de arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) aktivitesine sahip bir enzimdir. İlk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından keşfedilen enzim2, sonraki yıllarda insan serum paraoksonazı (PON1) olarak isimlendirilmiş olup, son derece zehirli organofosforlu tarım ilacı parationun toksik metaboliti paraoksonu (organofosfor substratı) hidroliz edebilmesinden dolayı bu şekilde tanımlanmıştır (Van Himbergen, 2006, Uysal vd., 2011).

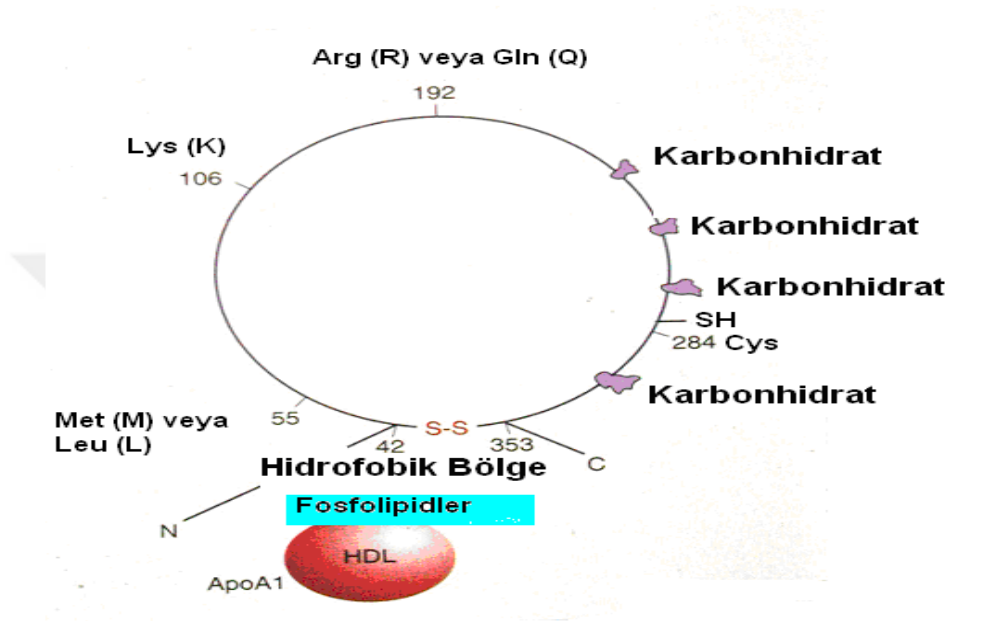
İnsanlarda 7q 21.3-22.1 kromozomunun uzun kolunda bulunan, paraoksonaz gen ailesi, birbiriyle bağlantılı PON1, PON2 ve PON3 şeklinde üç üye bulunmaktadır. İnsanda karaciğerde sentezlenip kana salınan PON1, 43 kDa moleküler ağırlığa sahip, 354 aminoasitin oluşturduğu bir protein olup, serumda genel olarak HDL ile ilişkilidir (La Du,1999, Uysal vd., 2011).

PON1'in genetik yapısı, canlılar arasında çok çeşitlilik göstermektedir. Serumda HDL'ye bağlı olarak bulunmaktadır. İzoelektrik noktası 5,1'dir. Molekül ağırlığının %15,8'ini oluşturan üç karbonhidrat zincir bulundurur. PON1'in yapısındaki amino asitlerde substratın tanınması ve bağlanması için gerek olan serbest sisteinlerden 284'teki serbest iken, 42. ve 352. durumdaki sisteinler arasında 1 tane disülfid bağı bulunmaktadır. Serbest sistein substratın bağlanması ve tanınması için gerekli ve önemlidir. PON1'in, HDL lipidleri ile etkileşimi için hidrofobik N-terminal bölgesi gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölge ile lipoproteinlere ve fosfolipidlere kolay bir şekilde bağlanma yeteneğine sahiptir. PON1'i bağlanmasını sağlayan HDL alt birimleri, Apo J (klusterin) ve Apolipoprotein AI (Apo AI) proteinlerini de içerdiğinden, Apo J ve Apo AI'in bağlanmada görev alabileceğini düşündürmektedir (Deakin, 2004, Aşkın, 2012).

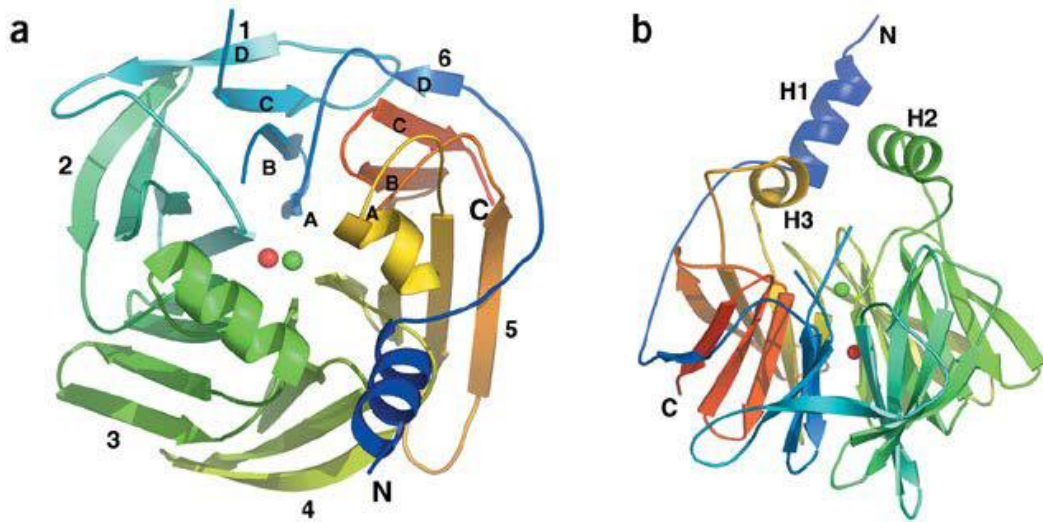
Serum paraoksonaz enzimi insanda iki genetik polimorfizm bulundurur. Bu polimorfizm 55. ve 192. durumların aminoasitlerdeki değişim ile meydana gelir. Yüz 192. durumdaki glutamin (Q aleli) arginin (R aleli) ile değişince birinci polimorfizm; 55. pozisyonundaki metionin (M aleli) lösin (L aleli) ile değişince ikinci polimorfizm

meydana gelir. 192. durumda glutamin varlığında PON1 A Tipi; 192. durumda arginin varlığında ise, B Tipi şeklinde ifade edilmiştir (Kelso, 1994, Aşkın, 2012).

Aşağıda Şekil.1.4.'de 55.ve 192. durumda iki polimorfik bölge belirtilmiştir. Halihazırda olan zincirin amino terminal ucun ve karbonhidrat zincirlerinde hidroforobik kısım gösterilmiştir (Aviram, 1999).



Şekil.1.4. Paraoksonazın yapısı (Aviram, 1999; Deveci, 2012)

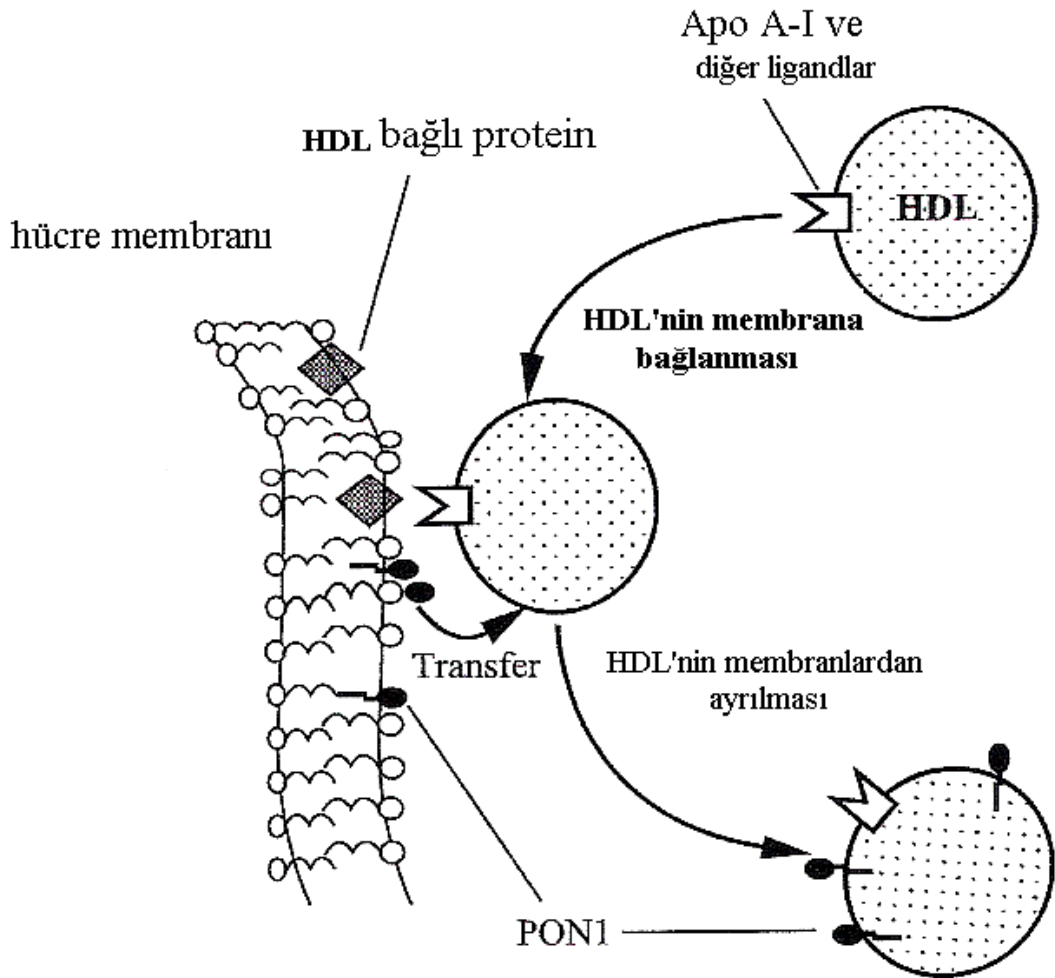


Şekil.1.5. Paraksonazın 3 boyutlu yapısı (Josse, vd., 1999; Deveci, 2012)

- a- 6'lı β pervane (heliks) yapısının üstten görünümü
- b- 6'lı β pervane yapısının yandan görünümü

1.2.2.2. Paraoksonaz ve HDL ilişkisi

Paraoksonaz 1 enzimi (PON1) serumda yüksek dansiteli lipoproteinler de (HDL) bulunan, organofosforlu pestisitlerin toksik etkili okson bileşikleri, bazı aromatik ve alifatik laktonları, karbamatları, okside lipitleri ve aromatik esterleri hidroliz eden, glikoprotein yapıda kalsiyum bağımlı bir enzim olduğu belirlenmiştir. İnsanda molekül ağırlığı 43-45 kDA olan PON1 genellikle 354 aminoasitten oluşan bir protein olarak karaciğerde sentezlenen bir enzimdir. Bu organdan kana salgılanması anında amino ucundan yalnızca metiyonin aminoasiti uzaklaştırılmakta ve geri kalan kısmı PON1'in HDL'ye bağlanması için gerekli olduğu belirlenmiştir (Sorenson,1999, Costa, 2003; Deveci, 2012).



Şekil.1.6. Paraoksonaz enziminin hücreden HDL'ye transferi

PON1'in pestisitlerden paraokson gibi organofosforlu insektisitlerin lipid peroksidasyonu ve detoksifikasyonuna katılmasına neden olan lipid peroksitleri

hidroliz ederek LDL'yi oksidasyondan korumak için bulunduğu belirtilmiştir (Mackness, 1998, Sorenson, 1999).

HDL'nin apo A-I ile ilişkili amino ucundaki hidrofobik bölgede PON1, LDL'nin oksitlenmesi ile oluşan proinflamatuvar molekülleri parçalayıp damar hastalıkları riskini en aza indirebilir. İn vitro olarak glutamin ve histidin bakiyelerinin, pozisyon yirmi ve yirmi bir'de alanin ile yer değişimi PON ekspresyonuna neden olur. PON'un lipoproteinler ile etkileşimi için N-terminal uçtaki hidrofobik sinyal sekansının gerekliliği araştırılmış; HDL ile PON birleşmesi ile alakalı olarak yapıda N-terminal ucta hidrofobik sinyal için peptidinin gerekli olduğu belirlenmiştir. N-terminal hidrofobik peptidin apolipoprotein eksikliğinde doğrudan fosfolipidlere bağlı bulunduğundan, PON'un dolaşımında HDL'deki fosfolipidlere bağlı halde bulunduğu tespit edilmiştir (Mackness, 1991; Uysal vd., 2011).

1.2.2.3. Paraoksonazın Organofosforlu İnsektisit Detoksifikasyonu

Organofosforlu insektisitlere karşı PON1'in en önemli görevi, hidroliz yolu ile, organofosfor türevi insektisitlerin zararlarını ve sinir gazlarını etkisiz hale getirmesi olarak belirlenmiştir. Yaygın olarak kullanılan paratyon ve klorpirofos-okson gibi organofosfor bileşikleri ile sinir gazları olan somon ve sarin gibi, PON1'in önemli substratları olduğu belirlenmiştir. Fakat, memeli canlılarda bulunan PON1'in bu substratlara karşı olan ilgisi zayıf olduğundan, tarımsal işçilerinin organofosforlu insektisit ile zehirlenmelerine sık rastlanmaktadır. Bu durumdan dolayı, organofosfor türevlerine maruz kalanlarda kronik olarak düşük dozda, PON1'in daha çok etki ettiği tespit edilmiştir. Organofosforlu insektisitlere karşı koruma, PON1'in yalnızca doku veya kan düzeylerine değil izoenzimlerine de bağlıdır. PON1'in, organofosforlu insektisitleri ve diğer organik esterleri hidroliz edebilme seviyesi, canlılar arasında geniş varyasyon gösterebilir. R tipi, Q tipine göre paraoksonun hidrolizinde daha etkili olmasına rağmen; organofosforuların çoğu, Q izoenzimi ile daha iyi hidroliz edildiği belirlenmiştir (Rodrigo, 2001; Başkol, 2004).

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Şenses vd., (1999), derleme makalesinde serbest radikaller ve antioksidan sistem hakkında genel bilgiler verilmiştir. Bilirubin in vitro potent bir antioksidan olduğu, Sarılıklı yeni doğan ratlarda hiperoksiye maruz bırakılan çalışma da solid dokularda etkisinin olmadığı, ancak yeni doğan için geçici bir antioksidan görevi görebileceğinden söz edilmiştir.

Öncü vd., (2002), Klorprifos-etil'in sıçan karaciğer dokusuna toksik etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirmiş, sonuç olarak, klorprifos etil'in karaciğer dokusunda antioksidan savunma sistemini bozduğunu ve antioksidan savunma potansiyelini azalttığı belirtilmiştir

Karaaytuğ, (2004), *Cyprinus carpio* (L.1758)'da Kadmiyumun doku birikimi ve serum parametrelerine etkileri araştırmış, tüm dokularda kontrole oranla önemli düzeyde birikim belirlendiği bildirilmiştir. Metalin kısa süreli etkisinde serum aminotransferaz, total protein, albumin ve glukoz düzeylerinin kadmiyumdan etkilendiği sürenin uzun tutulması sonucunda ise bu etkinin ortadan kalktığı belirtilmiştir.

Başkol ve Köse, (2004), Paraoksonazın biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemine vurgu yapmış olup, bu derlemenin ilerdeki çalışmalara ışık tutucu olduğu belirtilmiştir.

Üstündağ vd., (2005) çalışmasında soy izoflavonların, (karbon tetra klorür) CCl₄ ile oluşturulan ratlarda plazma arilesteraz ile paraoksonaz enzim düzeyleri ve karaciğer hasarı üzerine etkileri araştırılmıştır. Soy izoflavonların antioksidan etkiye sahip olduğu ve soy izoflavon uygulamasının oksidasyonu engellemede paraoksonaz enzimi gibi bazı antioksidan özellik göstererek enzimleri de stimule ettiği belirtilmiştir.

Köse ve Uysal, (2008), Enne Barajında (Kütahya) kaplıca suları ile beslenen cinsi olgunluğa erişmemiş pullu sazanların (*Cyprinus carpio*) deri, solungac ve kasında ağır metal birikimi oranları araştırmıştır. Kas dokuda metal seviyelerinin solungaçlardan önemli derecede düşük bulunduğu belirtilmiştir.

Kurban vd., (2010), Multiple skleroz (MS) hastalarında serum arilesteraz ve paraoksonaz aktiviteleriyle oksidatif stres araştırmıştır. Sonuç olarak MS hastalarına ait TAS seviyeleri kontrol grubuna bakarak anlamlı derecede düşük bulunmuş ve sebebinin bilinemediği vurgulanmıştır. MS’de endojen antioksidanların artan oksidatif stres sonucu tüketilmiş olabileceği hastalara ek olarak antioksidan takviyesinin faydalı olabileceği bildirilmiştir.

Bayır ve Atamanalp, (2011), Saponin’in Gökkuşaağı Alabalığı’nda (*Oncorhynchus mykiss*) bazı antioksidan enzim aktiviteleri, HSI ve ağırlık artışı üzerine etkileri araştırmıştır. Çalışma sonunda GR (Glutasyon redüktaz) ve G6PD (Glikoz 6- fosfat dehidrojenaz) enzim aktivitelerinin kontrol grubuna oranla diğer gruplarda düşüş gösterdiği, GR’deki düşüş istatistiki olarak önemli bulunmuştur. G6PD’deki değer düşüklüğü önemli bulunmamıştır. canlı ağırlık artışı ve HSI parametrelerinde en yüksek değer kontrol grubunda bulunmuştur.

Uysal vd., (2011), derleme makalesinde, paraoksonazın normal fizyolojik görevlerinin yanında hastalıkların etiyopatogenezinde sahip olduğu rolü analiz etmeyi amaçlamış, enzimin transkripsiyon ve translasyon öncelikli olmak şartıyla düzenleyici mekanizmaları ile beraber moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılması, enzimin antioksidan etkisini belirlemek için agonistlerden yararlanmada ilerde topluma yardımcı olabileceği belirtilmiştir.

Alak vd., (2011), çalışmasında pestisitlerin, tarımda zarar meydana getiren canlıları kontrol edebilmek amacıyla kullanıldığı, bu kimyasallar konsantrasyonlarına ve özelliklerine göre akuatik organizmalara doğrudan ya da dolaylı etki ettiği belirtilmiştir. Derlemede, pestisitler ile ilgili öncelikle sucul canlılardaki antioksidan enzim aktivitelerine etkilerinin incelendiği çalışmalar bir araya getirildiği bildirilmiştir.

Aşkın vd., (2012), Paraoksonaz-1 enziminin bazı kinetik özelliklerinin incelenmesi ve Ghrelin hormonu ile ilişkisini incelemiştir. Paraoksonaz-1 enziminin pH:7.1 ve 37°C’de optimum aktivite gösterdiği saptandığı, Paraoksonaz-1 enziminin aktif ghrelin hormonuna etki ettiği ve aktif ghrelin hormonunu 20 dakika sonunda % 9.5 oranında inaktif ghreline dönüştürdüğü tespit edildiği belirtilmiştir.

Deveci., (2012), çalışmasında farelerde Klorprifos-etil ile deneysel Parkinson oluşturulmuş beyin dokusu ve plazma PON1 aktivitesi, TAS ve TOS seviyeleri üzerine CAPE’nin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, tarımda yaygın olarak kullanılan CPF’nin deneysel Parkinson oluşumunda kullanılabileceği, CAPE’nin deneysel Parkinson’da beyin dokusu ve plazma PON1 aktivitesi, TAS artarken, TOS, seviyelerini ise düşürdüğü ve beyinde ise oluşan nörodejenerasyonlara karşı koruma etkisinin olabileceği belirtilmiştir.

Kaya vd., (2014) ise, *Cyprinus carpio* (L., 1758)’da tebukonazol’ün serum oksidan (TOS), total antioksidan (TAS) ve düzeylerine etkisini araştırmıştır. Kontrol grubuna kıyasla serum TAS düzeyleri fungusit uygulanmış gruplarda azalmış, ve TOS bakımından artış olduğu, tebukonazol uygulamasının *Cyprinus carpio*’nun serum TOS ve TAS düzeylerinde önemli değişimler meydana getirdiği bildirilmiştir.

Ekmekyapar vd., (2014), Klorprifosun, *Daphnia magna* (Su piresi) kullanarak toksitesinin araştırılması ve çevresel risk değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Daphnia magna* ‘da yapılan toksisite analiz sonuçlarına göre, klorprifos yoğunluğu arttıkça toksisitede % 45’ e varan artış gözlemlendiği bildirilmiştir.

Uslu vd., (2016), Cypermethrin uygulanan İsrail Sazanı’nda (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) oksidatif stres parametrelerine etkisini araştırmış, Cypermethrin ve benzeri pestisitlerin bilinçsiz ve kontrolsüz kullanımı halk sağlığını olumsuz etkilediği ve çevrede ekolojik sorunlara yol açtığı bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarının ise kısa bir süre Cypermethrin’e maruz kalınmasında bile oksidan ve antioksidan dengesinde oldukça önemli bozulmalara sebep olduğu belirtilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada Tahtaköprü Barajı'ndan tutulan ve her birinin ortalama ağırlığı 200-220 gr. olan 30 adet *Cyprinus carpio* (L. 1758) kullanıldı. Balıkların laboratuvara nakli sağlanarak 10 gün boyunca balıklarda 1 g/L olacak şekilde su bulunan polietilen tanklarda (22-25 °C ve normal fotoperiyod) yeni ortama adaptasyonları sağlandı. Gruplar oluşturulurken balıklar tartılarak, grupların birbirine eşdeğer ağırlıkta olması sağlandı. Daha sonra her grupta 10 adet olacak şekilde balıklar; kontrol grubu, 0.040 mg/L CPF I ve 0.080 mg/L CPF II grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 14 günlük uygulama sonunda balıklardan kaudal venadan kan örnekleri heparinli tüplere alındı. Daha sonra +4 °C'de, 3000 rpm' de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri analizler yapılncaya kadar -20 °C' de saklandı.

3.2. Metot

3.2.1. Kullanılan Alet ve Malzemeler

1. Soğutmalı santrifüj (Heraeus christ)
2. Spektrofotometre (Microplate Reader Epoch, Shimadzu UV-1201))
3. Hassas terazi (Scaltec)
4. Deiyonize su cihazı (Heidolpph, type-mono, Dest-3000)
5. Vorteks (Labinco)
- 6.pH metre (inoLab)
7. Otoanalizör (HumaStar 600)
8. Buzdolabı (-20 °C) (Bosch)
9. Ayarlanabilir otomatik pipetler (Axygen 5-1000 µl)
- 10.Homojenizatör (Wiggen Hauser)
11. Manyetik karıştırıcı (Labinco-532)

3.2.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Total oksidan seviye kiti (Rel Assay)
2. Total antioksidan seviye kiti (Rel Assay)
3. Paraokson (Supelco)
4. Klorprifos-etil (Hektaş Ticaret A.Ş)
5. Monosodyum hidrojen fosfat (Fluka)
6. Sodyum hidroksit (Sigma-Aldrich)
7. Sodyum klorür (Sigma-Aldrich)
8. Disodyum hidrojen fosfat (Fluka)
9. Kalsiyum klorür (Sigma-Aldrich)
10. Trisma (Sigma-Aldrich)
11. Aseton (Sigma-Aldrich)
- 12.Tris-HCl (Sigma-Aldrich)
13. Hidroklorik asit (Merck)
- 14.p-dimetil amino benzaldehid (Merck)

3.2.3. Biyokimyasal Ölçümler

3.2.3.1. Plazma Total Antioksidan/Oksidan Seviye

Plazma TAS ve TOS ölçümleri, Erel'in geliştirdiği metoda göre yapıldı. (Erel 2004, Erel 2005).

3.2.3.1.a. Total Antioksidan Seviye

Prensip: Bu ölçüm mavi-yeşil renkli ABTS radikal katyonunun renk kaybı prensibine dayanmaktadır. Örneklerdeki antioksidan moleküller, mavi-yeşil renkteki ABTS radikalini renksiz ABTS formuna dönüştürürler. Spektrofotometrede 660 nm'de meydana gelen absorbans değişikliği örnekteki toplam antioksidan miktarıyla ilişkilidir. Vitamin E'nin analogu olan Trolox Equivalent (standart antioksidan çözümü) ile kalibre edilir ve sonuçlar mmol Trolox Eq./L olarak gösterilir.

Kullanılan Standart ve Reaktifler

Standart-1:0.0 mmol Trolox Eq./L (Kör çözeltisi)

Standart-2: 1.0 mmol Trolox Eq./L çözeltisi

Reaktif-1: Test tamponu

Reaktif-2: Renklendirilmiş ABTS [2,2'-azino-bis(3-etil benzthiazoline-6-sülfonik asit)] radikal çözültisi

Tablo 3.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)

	1.Okuma		2.Okuma
Std-1	Mikroplak içine 200 µl reaktif-1 + 12 µl Std-1 ekle		Birinci Okumadan sonra mikroplağa 30 µl reaktif-2 ekle 10 dakika Oda ısısı (inkübasyon)
Std-2	Mikroplak içine 200 µl reaktif-1 + 12 µl Std-2 ekle		Birinci Okumadan sonra mikroplağa 30 µl reaktif-2 ekle 10 dakika Oda ısısı (inkübasyon)
Numune	Mikroplak içine 200 µl reaktif-1+ 12 µl numune ekle		Birinci Okumadan sonra mikroplağa 30 µl reaktif-2 ekle 10 dakika Oda ısısı (inkübasyon)
	660 nm'de Absorbans-1 oku		660 nm'de Absorbans-2 oku

Sonuç Hesaplama;

Sonuç = $\frac{[(\Delta \text{Abs Std1}) - (\Delta \text{Abs Örnekte})]}{[(\Delta \text{Abs Std1}) - (\Delta \text{Abs Std2})]}$

Δ Standart-1'in absorbansı = (Std-1'in ikinci absorbansı – Std-1'in ilk absorbansı)

Δ Standart-2'nin absorbansı = (Std-2'in ikinci absorbansı – Std-2'in ilk absorbansı)

Δ Örn. absorbansı = (Örn. ikinci absorbansı – Örn. ilk absorbansı)

3.2.3.1.b.Total Oksidan Seviye

Prensip: Numune içerisinde bulunan oksidan moleküller, ferröz iyon-o-dianisidine bileşiğini ferrikiyona okside ederler. Gliserol tepkimeyi hızlandırarak, bulunduğu ortamda tepkime hızını ortalama üç katına çıkarır. Asidik ortamda ferrik iyonlar xilenol orange ile renkli bileşik meydana getirirler. Numunede bulunan oksidan

moleküllerin miktarıyla ilişkili olan renkşiddeti spektrofotometrede ölçülür. Sonuçlar hidrojen peroksitle kalibre edilir ve $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq./L}$ olarak verilir.

Kullanılan Standart ve Reaktifler

Standart-1: Kör çözeltisi (deiyonize su)

Standart-2: Stabilize edilmiş standart stok çözeltisi (800 mM $\text{H}_2\text{O}_2\text{Eq./L}$, 10 ml x1)

Reaktif-1: Test tamponu (50 ml x1)

Reaktif-2: Prokromojen çözeltisi (10 ml x 1)

Stok çözeltiden 50 μl alınır 10 ml deiyonize su ile karıştırılır. Bu karışımdan 50 μl alındıktan sonra 10 ml deiyonize su tekrar karıştırılıp vortekslenir. Böylece standart-2 stok çözeltisi 40.000 kat sulandırılmış oldu. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı.

Tablo 3. 2. Total Oksidan Seviye (TOS)

	1.Okuma		2.Okuma
Std-2	Mikroplak içine 300 μl reaktif-1 + 45 μl Std-2 ekle		Birinci Okumadan sonra mikroplığa 15 μl reaktif-2 ekle 10 dakika Oda ısısı (inkübasyon)
Nunume	Mikroplak içine 300 μl reaktif-1 + 45 μl numune ekle		Birinci Okumadan sonra mikroplığa 15 μl reaktif-2 ekle 10 dakika Oda ısısı (inkübasyon)
	530 nm'de Absorbans-1 oku		530 nm'de Absorbans-2 oku

Sonuç Hesaplama;

Sonuç = $[(\Delta\text{Abs Örn.}) / (\Delta\text{Abs Std-2})] \times 20$ (Std-2 değeri)

$\Delta\text{Abs Örn.}$ = Örneğin ikinci absorbansı – örneğin ilk absorbansı

$\Delta\text{Abs Std-2}$ = Standart-2'nin ikinci absorbansı – standart-2'nin ilk absorbansı

Std-2 değeri = 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{Eq./L}$

3.2.3.2. Plazma Paraoksonaz Aktivite Ölçümü

Plazma paraoksonaz enzim aktivitesi, Eckerson (1983), Gürsu ve Gülcü (2003)'nün metotlarına göre yapıldı.

Prensip: PON1 tarafından paraoksonun (0,0-dietil-0-p-nitrofenilfosfat) hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün 25°C'de spektrofotometrik olarak 412 nm'de absorbensinin ölçülmesi esasına dayanır. PON1 aktivitesi, p-nitrofenolün molar absorpsiyon katsayısı ve deneyde yapılan dilüsyonlar göz önünde bulundurularak U/L şeklinde verildi. Dakikada 1 µmol paraoksonu, p-nitrofenol'e dönüştüren enzim aktivitesi U (Ünite) olarak belirlendi (Eckerson1983).

Deneyde Kullanılan Çözeltiler

Hidroklorik asit çözeltisi (0.1M) (a): 10 mililitrelik 1 M HCl çözeltisinin hacmi, distile suyla 100 mililitreye eşitlendi.

Tris Çözeltisi (0.1 M) (b): 1.21 g tris distile suda çözülerek, hacmi 100 mililitreye eşitlendi.

Tris-HCl Tamponu (20 mM, pH:8): 29 mililitre a-çözeltisi üzerine 50 mililitre b-çözeltisi eklendi ve pH'sı 8'e ayarlandı. Daha sonra distile suyla 100 mililitreye eşitlendi.

Çalışma Solüsyonu [kalsiyum klorür-paraokson (2 mM)]: Bir miktar tris-HCl üzerine 29.4 mg kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) eklenir. Bunun üzerine 1.5 ml asetonda çözülen 44 µl paraokson eklenir ve tris-HCl tamponu ile hacmi 100 mililitreye eşitlenir.

Deneyin Yapılışı:

Her bir numune ve kör mikropiçine 280 µl çalışma solüsyonu eklendi. Daha sonra kör mikropiçine 8 µl distile su, numune mikropiçine ise 8 µl plazma eklendi. 25°C'de, 2 dk süreyle köre karşı numunenin 412 nm'deki absorbens artışı belirlendi. ($\Delta A/\text{dk}$: dakikadaki absorbens farkı).

$$U/L (\mu\text{mol/dk/L}) = \frac{\Delta A/\text{dk} \times \text{SF} \times 106}{\epsilon \times 1/0.6}$$

$\Delta A/\text{dk}$: Dakikadaki absorbans değışimi

ϵ : p-nitrofenolün molar absorbsiyon katsayısı (mevcut deney şartları için 18290)

SF: Seyreltme faktörü (Total hacim/Numune hacmi)

106 : μmole çevirme faktörü

1/0.6: Plate ışık yolunun uzunluğu

3.2.3.3. Plazma HDL Ölçümü

Plazma HDL ölçümü ticari kitler kullanılarak otomatik analizörde belirlendi.

3.2.4. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmada elde edilen sonuçların istatistiksel hesaplamaları, İstatistik Paket Programı SPSS 16.0 for Windows kullanılarak yapıldı. Gruplarda anlamlı ilişki olup olmadığı, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. İstatistiksel olarak hangi gruplar arasında farklılıkların olduğunu belirlemek için çoklu karşılaştırma (*post hoc*) analiz testlerinden, Tukey testi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak verildi.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacının karşılanması amacıyla tarım alanlarında bitkisel üretim düzeyini olumsuz etkileyebilecek böcek popülasyonuna karşı kullanılan organofosforlu bileşikler özellikle yer altı ve yer üstü su kaynaklarına karışabilmektedir. Bu şekilde su kaynaklarındaki faunanın bundan ne şekilde etkilenebileceği, organofosforlu bileşiklerin etki düzeyinin ne derece toksik bir karakter taşıyabileceği sorularının cevabı, sucul yaşamın sürdürülebilir olması ve bunları nihayetinde tüketen insanlar için gıda güvenliği açısından son derece önemlidir.

Deneysel kurgulanan çalışmamızda toksikasyon düzeyinin biyokimyasal parametreler ile gösterilebilmesi için sucul ekosistemde önemli bir indikatör olan ve detoksifikasyon mekanizmaları bilinen balık türlerinden (*Cyprinus carpio*) seçilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu, 0.040 mg/L CPF I grubu ve 0.080 mg/L CPF II grubu olmak üzere 3 grup oluşturuldu. 14 günlük uygulama sonunda balıklardan kan örnekleri alındı ve plazmaları ayrıldı. Elde edilen plazma örneklerinde TOS/TAS seviyeleri, PON1 aktivitesi ve HDL düzeyleri analiz edildi.

4.1. Biyokimyasal parametreler

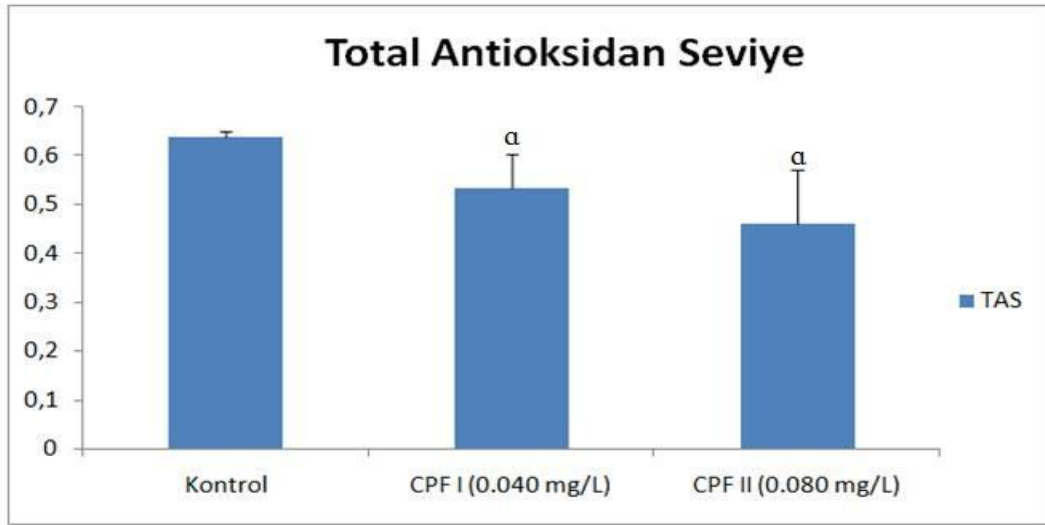
Plazma total antioksidan seviye, total oksidan seviye, paraoksonaz aktivitesi ve yüksek dansiteli lipoprotein düzeylerine ait ölçüm sonuçları tablo 4.1.'de verilmiştir. Tablo 4.1. Kontrol ve deney gruplarına ait TAS/TOS, PON1 ve HDL seviyeleri.

Biyokimyasal Parametreler	Kontrol (n=10)	CPF I (0.040 mg/L) (n=10)	CPF II (0.080 mg/L) (n=10)	P<
TAS (mmol Trolox Eqv./L)	0.639±0.0105 ^a	0.533±0.069 ^b	0.46±0.11 ^b	0.001
TOS (μmol H ₂ O ₂ Eqv./L)	3.68±0.46 ^a	4.50±0.48 ^b	4.71±0.36 ^b	0.001
PON (U/L)	46.70±5.73 ^a	35.10±4.72 ^b	31.80±5.67 ^b	0.001
HDL (mg/dL)	54.40±5.73 ^a	41.60±6.83 ^b	37.70±5.18 ^b	0.001

^a, ^b: Aynı satırda farklı harfler arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğunu göstermektedir (p< 0.001), n: Her gruptaki canlı sayısı

4.1.1. Plazma Total Antioksidan Seviyeleri

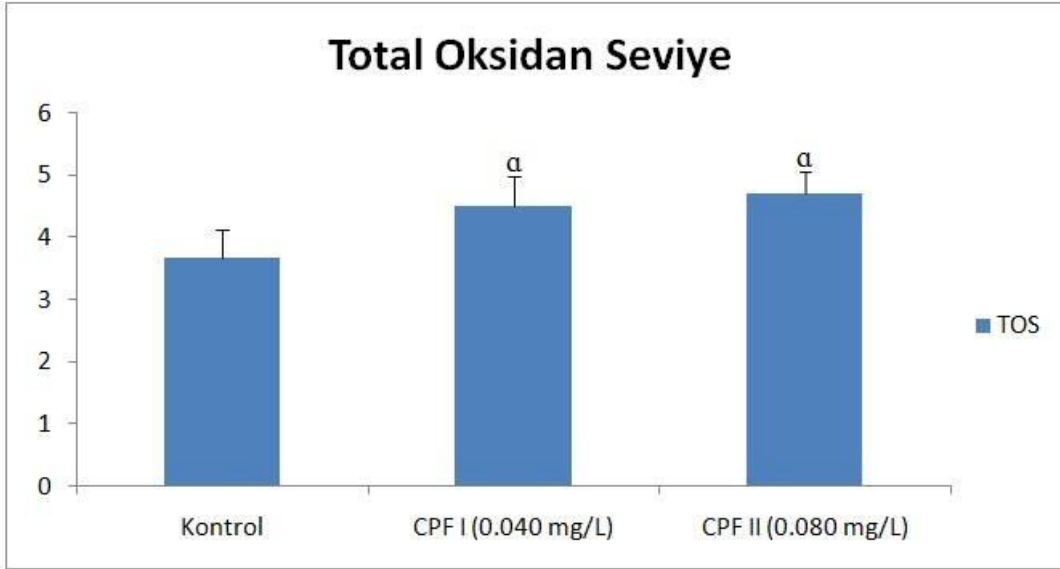
Ölçümlerimizde elde edilen veriler değerlendirildiğinde kontrol, CPF I ve CPF II gruplarında total antioksidan seviye sırasıyla 0.639, 0.533 ve 0.46 mmol Trolox Eq./L bulunmuştur. Plazma TAS seviyeleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edildi ($p<0.001$). Klorprifos uygulanan gruplarda (CPF I ve CPF II) kontrol grubuyla karşılaştırılmasında TAS seviyesinde anlamlı derecede bir azalış saptandı ($p<0.001$).



Grafik 4.1.1. Kontrol ve deney gruplarına ait total antioksidan seviyeler. ^aKontrol grubu ile önemli istatistiki fark ($p<0.001$).

4.1.2. Plazma Total Oksidan Seviyeleri

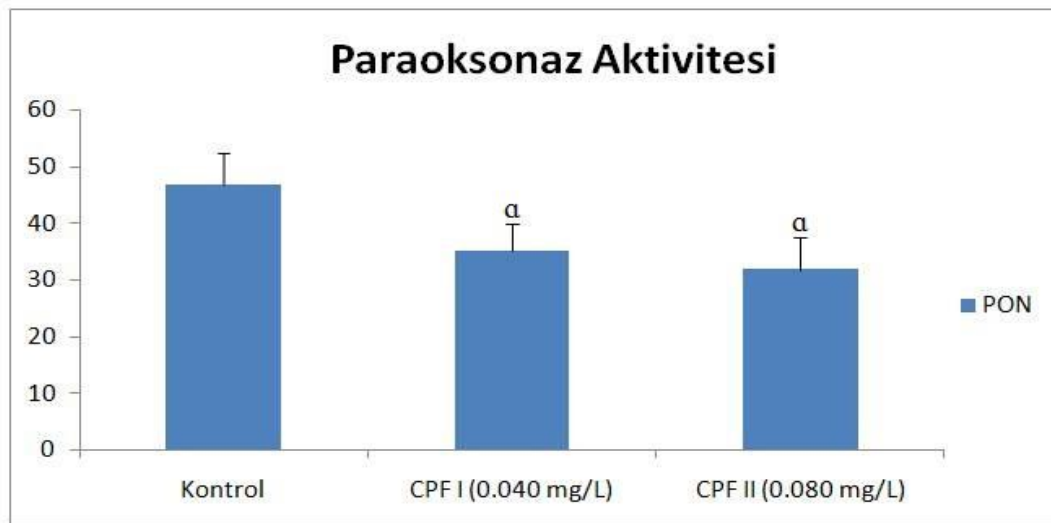
Kontrol, CPF I ve CPF II gruplarında sırasıyla total oksidan seviye 3.68, 4.50 ve 4.71 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq./L belirlenmiştir. Gruplar arasındaki plazma TOS seviyeleri incelendiğinde, gruplar arasında istatistiki önemde bir fark olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Klorprifos doz uygulamasının artışı ile oksidan seviyesinde artışı belirlendi. Pestisit uygulanan her iki grup (CPF I ve CPF II) ile kontrol grubu arasında istatistiki anlamda fark önemlidir ($p<0.001$).



Grafik 4.1.2. Kontrol ve deney gruplarına ait total oksidan seviyeler. ^aKontrol grubu ile önemli istatistiki fark ($p < 0.001$).

4.1.3. Plazma Paraoksonaz (PON1) aktivitesi

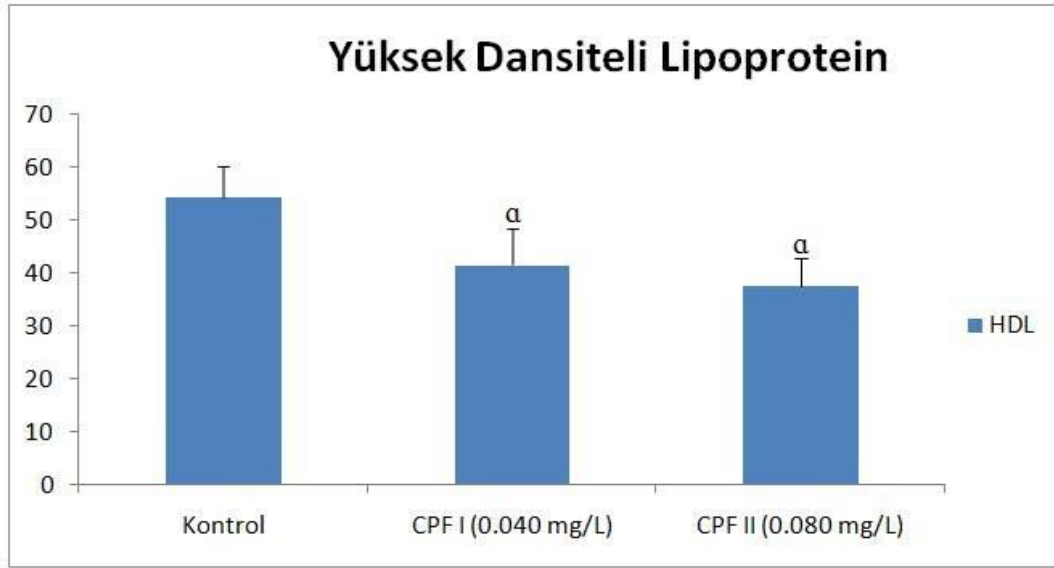
Kontrol, CPF I ve CPF II gruplarında paraoksonaz aktivitesi sırasıyla 46.70, 35.10 ve 31.80 U/L saptanmıştır. Kontrol grubuna kıyasla madde verilen gruplarda paraoksonaz aktivitesinde bir azalış belirlendi. Her iki gruptaki (CPF I ve CPF II) bu azalış kontrol grubu ile istatistiki anlamda önemli bir fark taşımaktadır ($p < 0.001$) tespit edilmiştir.



Grafik 4.1.3. Kontrol ve deney gruplarına ait paraoksonaz aktiviteleri. ^aKontrol grubu ile önemli istatistiki fark ($p < 0.001$).

4.1.4. Plazma HDL Seviyeleri

Analiz sonucu kontrol, CPF I ve CPF II gruplarında yüksek dansiteli lipoprotein düzeyleri sırasıyla 54.40, 41.60 ve 37.70 mg/dL olarak belirlendi. Yüksek dansiteli lipoprotein miktarları klorprifos uygulanan gruplarda (CPF I ve CPF II) kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalma göstermiştir ($p<0.001$).



Grafik 4.1.4. Kontrol ve deney gruplarına ait yüksek dansiteli lipoprotein düzeyleri.

^aKontrol grubu ile önemli istatistiki fark ($p<0.001$).

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇ

Zararlılarla mücadelede kullanılan pestisitler her ne kadar daha fazla ürün elde edilmesi ve gıdaların zararlılardan korunması için kullanılsa da bu kimyasallar ekolojik sistem ve canlı organizmalar üzerinde olumsuz etkiler meydana getirmektedir. Pestisitler tarım ürünlerinin verim ve kalitesinde azalmaya sebep olan zararlıları kontrol etme konusunda kolaylık sağladığı için daha çok tercih edilmektedir. Günümüzde organofosforlu bir insektisit olan Klorprifos-etil tarım alanında yaygın olarak kullanılan bir böcek ilacıdır. Bu insektisit her ne kadar bitkilere zarar veren böcekleri hedef alsa da yağmur suları, drenaj suları ve yer altı sularına karışarak akarsu, göl ve deniz gibi sucul ekosistemde yaşayan canlıları da etkilemesi söz konusudur. Ayrıca sucul ekosistemde insektisitlerin biyokonsantrasyonu besin zinciri yoluyla balıklarda en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Yapılan bir çok çalışmada besin zinciri yoluyla pestisitlerin akut ve kronik etkilerinin canlılar üzerinde genotoksik, embriyotoksik, nörotoksik ve karsinogenik etki yarattığı bildirilmiştir (Stephen vd, 1997; Eaton vd, 2008; Deveci, 2015).

Yapılan bu çalışmada, balıklara farklı konsantrasyonlarda verilen Klorprifos-etil'in plazma PON1 aktivitesi, total oksidan ve total antioksidan seviyeleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Diğer omurgalı canlılardan farklı olarak balıklar hem mevsimsel hem de günlük sıcaklık ve oksijen değişimine maruz kalabildikleri gibi kararsız çevre koşullarına da ayak uydurabilirler. Bu mekanizmalar enzimatik olan ve enzimatik olmayan yapıları içine alır (Borazan ve Özkurt, 2006).

Balıkların oksidatif strese korunması, suda ve yağda çözünebilen antioksidan vitaminlerce sağlanır. Bu korunma balıktan balığa değişmekle birlikte yüksek oranda balıkların kas dokusunda bulunduğu belirtilmektedir. Antioksidan enzim miktarı balığın yaşamı sona erdikten sonra artan lipid peroksidasyonu sonucu azalır.

Antioksidanlar üzerinde son yıllarda yapılmış olan çalışmalar insanlar için antioksidanların önemine dikkat çekmektedir. Balıklarda çeşitli antioksidanlar üzerinde yapılan çok sayıda araştırmayla birlikte, balıklardaki endojen antioksidanlar arasındaki etkileşim üzerine araştırma oldukça yetersizdir (Gökhan, 2007).

Propiconazole ile yapılan bir çalışmada Propiconazole uzun süreli maruz kalmanın, gökkuşağı alabalığı beyninin antioksidan savunma sistemi ve Na (+), K (+), ATPaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Gökkuşağı alabalıklarının (*O.mykiss*) değişik zamanlarda (7 gün, 20 gün ve 30 gün) ve farklı yoğunluktaki (0,2 µg/l, 50 µg/l ve 500 µg/l) Propiconazole maruz bırakıldığı belirtilmiştir. Çalışmada 7 günlük olan kısımda antioksidan mekanizmanın bu etkiye uyumla cevap verdiği bildirilmiştir. Oksidatif stresin göstergelerinin 20 günlük ve 30 günlük süre zarfında ise yüksek seviyelere çıktığı, antioksidanlarda inhibisyon görüldüğü belirtilmiştir. Uzun süreli uygulamalarda ise oksidasyona uğradığı bildirilmiştir (Li vd, 2010).

Diğer bir çalışmada, Cypermethrin uygulanmış *Carassius gibelio*'nun kas, karaciğer ve böbrek gibi farklı dokularıyla serum örneklerindeki etkileri incelenmiştir. 96 saat gibi kısa bir süre zarfında oksidasyonu arttırdığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra antioksidan mekanizmaların inhibe olduğu ve organizmanın önemli boyutlarda oksidatif strese maruz kaldığı belirtilmiştir (Uslu vd, 2016).

Diğer bir çalışmada Zebra balıklarına (*Danio rerio*) farklı yoğunlukta ağır metal (kadmiyum, bakır, çinko) uygulandığı belirtilmiştir. Muamele sonrasında solungaç dokularında lipit peroksidasyon ile Glutatyon (GSH), Malondialdehit (MDA), Katalaz (CAT) gibi antioksidanlar ve total protein seviyelerinin incelendiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda ise Çinko, Bakır ve Kadmiyumun çok az yoğunlukta, solungaçlardaki antioksidan mekanizmalarını aktive ettiği belirtilmiştir (Ünver vd., 2014).

Yapılan bir derleme makalesinde pestisitlere ve ağır metale maruz bırakılan sucul canlılarda oksidatif stres belirteçleri ve antioksidan savunma mekanizmalarının araştırıldığı bildirilmiştir. Canlıların sahip olduğu özelliklerden biri de hücre ve dokularındaki enerji akışının kontrol edilmesi olduğundan bahsedilmiştir. Serbest radikallerin oluşumu ile gelişen oksidatif stresin çeşitli sistemler ile biyomoleküllere

zarar verdiği bildirilmiştir. Bunun sonucunda akuatik canlılarda antioksidan savunma mekanizmaları, evre koşullarına bağlı olarak değişen ve adaptasyona bağlı olarak bazı yanıtlar geliştirdiği belirtilmiştir. Akuatik organizmaların organ ve dokularında tespit edilen cevaplar, asıl olarak ekolojik çevrenin tamamıyla negatif etkilendiğinin de bir göstergesi olduğu sonucuna varılmıştır (Akbulut vd., 2014).

Antioksidan ve oksidan parametrelerin ayrı ayrı ölçülmesinin ya da birlikte ölçülmesinin karşılaştırıldığı çalışmalarda, canlı organizmada antioksidan ve oksidanların birbirleriyle sinerjistik etkileşimi olabileceğinden bu parametrelerin tek tek ölçülmesinden ziyade total oksidan ve total antioksidan seviyelerinin ölçülmesinin daha uygun olabileceği bildirilmiştir (Erel, 2004; Erel 2005).

Kaya vd'lerinin yaptığı çalışmada *Cyprinus carpio* (L. 1758)'da kullanılan fungusit tebukonazol'un serum total oksidan (TOS), total antioksidan (TAS) düzeylerine etkilerinin araştırıldığı belirtilmiştir. Çalışmada tebukonazol uygulanan gruplarda kontrol grubuna oranla serum TAS düzeylerinin azaldığı bildirilmiştir. Diğer yandan ise TSA ve TOS bakımından artışlar olduğu belirtilmiştir (Kaya vd., 2014).

Yaptığımız alışmamızda yaşam ortamlarına 0.040 ve 0.080 mg/L CPF uygulanan balıklarla, CPF uygulanmamış kontrol grubu balıklardan 14 gün sonra alınan kan örneklerinde biyokimyasal parametreler değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla CPF gruplarında (0.040 ve 0.080 mg/L) TOS düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği ($p<0.001$), buna karşın TAS düzeyinin ise önemli derecede azaldığı ($p<0.001$) tespit edildi. Yaşam ortamlarına farklı konsantrasyonlarda CPF uyguladığımız balıklarda TAS düzeyinin azalmasının, TOS düzeyinin ise artmasının nedenin CPF'nin serbest radikal üretimini arttırarak lipid peroksidasyonunu başlattığı ve oksidatif hasara neden olduğu kanısındayız.

Sucul organizmalarda biyobelirteçler, oksidatif stres tayininde büyük bir rol oynamaktadır. evre kirliliğinin önemli biyolojik belirleyicileri; glutatyon, antioksidanlar, malondialdehit, stokrom P-450 monooksijenazlar ve karmaşık fonksiyon oksidaz sistemi faz II enzimleridir (Borazan ve zkurt, 2006).

Organofosforlu ve karbamatlı insektisit kirliliğinin analizinde Asetilkolinesteraz aktivitesi yüksek özelliği olan biyolojik belirteçtir. Lipid peroksidasyonu ve katalaz oksidasyon belirteçlerdir. Glutasyon S-transferaz enzim aktivitesi ise metal kirliliği ve organik bileşikler ile ilgilidir (Narbonne, 2005).

HDL, işlev yönünden aktif bir lipolipoproteindir. Kolesterol taşınmasında ve metabolizmasında etkin katkısının yanı sıra, sazan, alabalık ve muhtemelen diğer teleost balıklarında mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklara karşı önemli bir savunma rolü vardır. Buna ilave olarak, HDL, hastalıklı balıklarda bile plazmada değişmeyen yüksek konsantrasyonları koruyan önemli savunma fonksiyonunu elinde tutacaktır (Villaruel vd., 2007, Karataş ve Kocaman, 2012).

Canlılarda organofosforlu insektisitlerin toksifikasyonu; Paraoksonaz enzimi (PON1), asetilkolinesteraz ve karboksilesteraz gibi enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Paraoksonaz (PON1) karaciğerde sentezlenen, organikfosforlu bir insektisit, parationun aktif bileşiği paraoksonu hidrolizleyen bir serum esterazdır (Gülcü ve Gürsu, 2003). HDL’de bulunan ve lipid peroksitleri hidroliz etme gücüne sahip olduğu belirtilen PON1’in HDL’yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir (Aviram vd, 1998, Ekmekçi vd, 2004, Bayrak vd 2005). Paraoksonaz lipid peroksitlerinin aterojenik etkisini nötrleştirdiği, hücre zarlarında koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Aviram vd., 2000, Ekmekçi vd., 2004).

Yapılan bir çalışmada, kültür gökkuşağı alabalığı ve albino gökkuşağı alabalığı serum paraoksonaz aktivitesi (PON), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve malondialdehit (MDA) seviyelerini karşılaştırmışlardır. Kültür gökkuşağı alabalığı grubunun serum numunelerinde saptanan PON/HDL, PON aktivitesi ve HDL düzeyleri albino gökkuşağı alabalığı grubundan daha yüksek bulunduğu belirlenmiştir. Kültür gökkuşağı alabalığı grubundaki ortalama ise MDA düzeyi albino gökkuşağı alabalığı grubuna göre daha düşük bulunduğu belirtilmiştir (Karataş ve Kocaman, 2012).

Başka bir çalışmada yabani akarsu alabalığı ve kültür akarsu alabalığında oksidatif stres hassasiyetinin saptanmasını amaçlamışlardır. Kültür akarsu alabalığına günlük %48-52 ham protein içeren ticari yemler vermişlerdir. Yabani akarsu alabalığına ise doğal gıdalar verildiği bildirilmiştir. Balıkların beslenme ve boyutlarındaki farklılık

yabani akarsu alabalığı ve kültür akarsu alabalığında MDA, PON aktivitesi ve HDL seviyesinin değişimi için önemli bir neden olabileceğinden söz edilmiştir. Balık ve hayvancılıkta serum PON ve HDL'nin yüksek seviyesi, dokuların ve hücrelerin zarar görmesini önleme açısından önemli olduğu belirtilmiştir. PON ile HDL ve MDA arasındaki ilişkiyi araştırmak için ise yeni çalışmaların gerekliliğinden bahsetmişlerdir (Karataş ve Kocaman, 2014).

Diğer bir çalışmada, farklı dozlarda çinko sülfat ($ZnSO_4$) verilen *Capoeta capoeta*'da plazmada paraoksonaz aktivitesi (PON1), total oksidan seviye (TOS) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) seviyelerini irdelemişlerdir. Çalışmada kontrol grubuna kıyasla artan $ZnSO_4$ miktarı ile birlikte plazma TOS seviyesinde önemli bir artış tespit edildiği belirtilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla artan $ZnSO_4$ miktarı ile birlikte plazmada PON1 aktivitesi ve HDL seviyelerinde ise bir düşüş gözlemlenmiştir (Deveci vd., 2015b).

Paraoksonaz enzimi ile HDL'nin ilişkili olduğu yapılan birçok çalışmada belirtilmiştir. Ancak balıklarda PON1 ve HDL ile ilgili yapılan çalışmaların kısıtlı olması bu çalışmanın önemini arttırmakta olup, çalışmamızın yapılacak olan sonraki çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

Yaptığımız bu çalışmada kontrol grubuna kıyasla CPF I ve CPF II gruplarında (0.040 ve 0.080 mg/L) PON1 aktivitesinin önemli derecede ($p<0.001$) azaldığı tespit edildi. CPF I (0.040) grubunda PON 1 aktivitesi daha yüksek iken CPF II grubunda daha da düşük olduğu olduğu gözlemlendi. Aynı şekilde kontrol grubuna kıyasla CPF I ve CPF II gruplarında (0.040 ve 0.080 mg/L) HDL seviyelerinin önemli derecede ($p<0.001$) azaldığı tespit edildi. CPF I (0.040) grubunda HDL seviyesi daha yüksek iken CPF II grubunda daha da düşük olduğu gözlemlendi. Buna göre yaptığımız çalışmada CPF I ve CPF II gruplarında PON1 aktivitesi ve HDL seviyelerinin kontrol grubuna göre düşük olmasının nedeni organofosforlu insektisit CPF'nin balıklarda lipit peroksidasyonunu başlatabileceği ve HDL'ye bağlı PON1 aktivitesinde aktivite kaybına neden olabileceği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak, tarım alanlarında yaygın bir şekilde kullanılan ve her geçen gün kullanımı artan organofosforlu bir insektisit olan CPF'nin *Cyprinus carpio* türü balıklarda artan dozlara bağlı olarak TOS düzeylerinin artması, PON1 aktivitesi,

TAS ve HDL seviyelerinin ise azalması balıklarda CPF'nin reaktif oksijen türlerinin artmasına neden olarak oksidatif stresi arttırdığı ve antioksidan sistemi zayıflattığını düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H.E., Yön, N., D., Kayhan, F.E. (2014). Balıklarda ağır metal ve pestisitler tarafından indüklenen oksidatif stres mekanizmaları. Derleme. Ege J. Fish Aqua Sci. 31(3): 155-160.

Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yay., Konya.

Akkuzu, E., Ayberk, H., Mol, T. (2001). Pestist kullanımı ve faydalı artropodlar üzerindeki etkileri. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi. 51 (2):seri B.

Akman, Y., Ketenoğlu, O., Kurt, L., Düzenli, S., Güney, K., Kurt, F., (2004). Çevre Kirliliği (Çevre Biyolojisi). Palme Yayıncılık, Ankara, 312 s.

Alak, G., Sönmez, A. Y., Hisar, O. (2011). Bazı Pestisitlerin Balıkların Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 42 (1): 91-93.

Altıkat, A., Turan T., Ekmekyapar-Torun, F., Bingöl, Z. (2009). Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 40 (2), 87-92.

Aşkın, U., Karataş, F., Türköz, Y., Aydın, S. (2012). Paraoksonaz-1 Enziminin Bazı Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi ve Ghrelin Hormonu ile İlişkisi. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 1:21-8.

Atmaca, E., Aksoy, A. (2009). Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. YYU Veteriner Fakültesi Dergisi. 20(2): 79-83.

Aviram, M., Billecke, S., Sorenson, R, vd. (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective active of human paraoxonase alloenzymes Q and R. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 10:1617-24.

Aviram, M. (1999). Does Paraoxanase play role in susceptibility to cardiovascular disease. *Mol. Medm Today*, 5: 381-386.

Aviram, M., Hardak, E, Vaya J, Mahmood, S, Milo, S, Hoffman A, Billicke, S, Draganov, D, Rosenblat, M. (2000). Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation*. 101: 2510-17.

Bejma, J. ve Ji, L. (1999). Aging and Acute Exercise Enhance Free Radical Generation in Rat Skeletal Muscles. *J. Appl. Physiol*. 87(1):465-470.

Başkol, G., Köse, K. (2004). Paraosonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi. Derleme. Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 26 75 (2) 75-80.

Bayır, M. C., Atamanalp, M. (2011). Saponin'in Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Canlı Ağırlık Artışı, HSI (Hepatosomatikİndeks) ve Bazı Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri. *Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi. Cilt 31, Sayı 1* 53-64.

Bayrak, T., Bayrak, A., Demirpençe, E., Kılınç, K. (2005). Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: Paraoksonaz. *Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Derleme. Hacettepe Tıp Dergisi*. 36:147-151.

Borazan-Özkurt, G. (2006). Balıklarda deniz kirliliğinin biyobelirteçleri, *Türk Veteriner Hekimler Birliği Dergisi*. 1 -2: 71-76.

Cankurtaran, M. (2005). Yaşlılık, yaşlanma mekanizmaları, antiaging ve yaşam tarzı değişiklikleri. *7. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitapçığı*, 1-5.

Ceron, J.J., Panizo, C.G., Montes, A. (1995). Toxicological effects in rabbits induced by endosulfan, lindane and methylparathion representing agricultural by products contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 54: 258-265.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British Med. Bull*. 49(3): 481-493.

Costa L.G Cole T.B, Jsrvik G.P, Furlong C.E. (2003). Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev. Med.* 54:371-392,.

Costa LG. (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clin Chim Acta.* 366:1-13.

Çiftçioğlu, G., Issa, G. (2006). Çevre ve gıdalardaki pestisit kalıntılarının halk sağlığına etkisi. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 32(3),91-96.

Deakin, S.P, James R.W. (2004). Genetic and environmental modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin. Sci.* 107: 435-47.

Demirdöğen, B. (2010). Organophosphate pesticide poisonings and the role of serum paraoxonase 1 (PON1) enzyme in organophosphate metabolism. *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.* 67: 97-112.

Deveci, H. A. (2012). Deneysel parkinson oluşturulan farelerde total oksidan/antioksidan kapasite, paraoksonaz aktivitesi, lipid profili ve total sialik asit üzerine kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi YÖK TEZ NO:351294.*

Deveci, H. A., Karapehlivan, M., Kaya, İ., Kükürt, A., Alpay, M. (2015 a). Akut klorprifos-etil zehirlenmesine karşı kafeik asit fenetil ester'in koruyucu etkisi. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 62, 255-260.

Deveci, H. A., Kaya, İ Yılmaz, M., Karapehlivan, M. (2015 b). Effect of zinc sulphate on the levels of plasma paraoxonase activity, total oxidant and high density lipoprotein of transcaucasian barb (Capoeta capoeta Guldentstaedt, 1773). *Fresenius Environmental Bulletin.* 24(9):2732-2735.

Dri, P., Bellavite, P., Berton, G., Rossi, F. (1979). Interrelationship between oxygen consumption, superoxide anion and hydrogen peroxide formation in phagocytosing guinea pig polymorphonuclear leucocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 23: 109– 122.

Dündar, Y, Aslan, R. (1999). Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü. *Hayvancılık Araştırma Dergisi.* 9(1- 2): 32-39.

Dwivedi, P. D, Mukul D, Khanna S. K. (1998). Role of cytochrome p-450 in quinalphos toxicity: Effect on hepatic and brain antioksidantenzymes in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 36 , 437-444.

Eaton M. vd., (1986). Seven Year Follow Up of Workers Exposed to 1, 2 dibromo 3 chloropropane, *JOcupMed*28, 1145-1150.

Eaton, D. L., Daroff, R. B., Autrup, H., Bridges, J., Buffler, P., Costa, L.G., Coyle, J., McKhann, G., Mobley, W.C., Nadel, L., Neubert, D., Schulte- Hermann, R., Spencer, P.S., (2008). Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in Toxicology.* 38(2): 1-125.

Eckerson, H.W., Romson, J., Wyte, C.M., La Du, B.N. (1983). The human serum paraoxonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts. *Am. J. Hum. Genet.* 35(2): 214-227,.

Ekmekçi, Ö. B., Donma, O., Ekmekçi, H. (2004). Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi. Cilt (Sayı) 35 (2),.*

Ekmekyapar, F., Tosun, C., Ataçoğlu, I. (2014). Klorprifosun *Daphnia magna* kullanarak toksitesinin araştırılması ve çevresel risk değerlendirilmesi Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt 3, Sayı 1, 1-8,.

Erel, Ö. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.* 37: 277-285.

Erel, Ö. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 38:1103-1111.

Estevez, E., Cabrera, M. C., Molina-Díaz, A., Robles-Molina, J., and Palacios-Díaz, M.P., (2012). Screening of Emerging Contaminants and Priority Substances (2008/105/EC) in Reclaimed Water for Irrigation and Groundwater in a Volcanic Aquifer (Gran Canaria, Canary Islands, Spain)”, Science of the Total Environment. 433, 538-546.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations), (2002). International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Retrieved on 2007-10-25.

Gan, K.N Smolen A, Eckerson H, La Du B.N. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase: evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug. Metab. Dispos.19:100-106,.

Gökhan, H. B. (2007). Balıklarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Fırat üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora semineri Elazığ.

Gülcü, F., Gürsu, M.F. (2003). Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. Turk J. Biochem. 28(2): 45-49.

Güler, Ç. Çobanoğlu, Z (1994). Su Kirliliği ISBN 975-7572-60-8 Aydoğdu Ofset, Ankara.

Güler, Ç., Çobanoğlu,Z (1997). Pestisitler ISBN 975 - 8088 - 69 – 6 İlköz Matbaası, Ankara.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1989). Free Radicals in Biology and Medicine. second ed. Clarendon Press, Oxford, UK.

Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. 11, 298–300.

Josse, D., Xie, W., Renault, F., Rochu, D., Schopfer, L.M., Masson, P., Lockridge, O., (1999). Identification of residues essential for human paraoxanase (PON1) arylesterase/organophosphatase activities. Biochemistry. 38(9): 2816-2825.

Karaaytuğ, S. (2004). Kadmiyumun *Cyprinus carpio* (L.1758)’da serum parametrelerine etkileri ve doku birikimi YÖK TEZ NO:151842.

Karabulut, H., Gülay, M. Ş. (2016a). Antioksidanlar. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Vet. Fak. Derg. 1 (1): 65-76.

Karabulut, H., Gülay, M. Ş. (2016b). Serbest Radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağ. Bil. Enst. Derg. 4(1): 50-59.

Karalliedde, L. D, Edwards P, Marrs T. C., (2003). Variables influencing the toxic response to organophosphates in humans. Food Chem Toxicol. 41:1-13.

Karataş, T., Kocaman, E. M. (2012). Comparison of Paraoxonase Activity, Malondialdehyde and High-Density Lipoprotein Levels in Cultivated Normal and Albino Rainbow Trout Reared in the Same Conditions. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.18 (1): 87-90.

Karataş, T., Kocaman, E. M. (2014). Susceptibility to oxidative damage in wild and cultured Brook Trouts (*Salvelinus Fontinalis* Mitchill, 1815). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies. 2(1): 180-183.

Karen, D.J., Li, W., Harp, P.R., Gillette, J.S., Bloomquist, J.R. (2001). Striataldopaminergic pathways as a target for the insecticides chlorpyrifos and permethrin. Neurotoxicology. 22(6): 811-817.

Kaya, İ.,Yılmaz, M., Koç, E., Deveci, H.A., Ersan, Y., Karapehlivan, M.,(2014). Tebukonazol (fungisit) uygulanan *Cyprinus carpio* (L. 1758) ‘ da serum total antioksidan, oksidan ve sialik asit düzeylerinin incelenmesi Journal of FisheriesSciences.com. 8(3): 214-219.

Kelley, E. E., Khoo, N.K., Hundley, N.J., Malik, U.Z., Freeman, B.A., Tarpey, M.M., (2010). Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. Free Radic. Biol. Med. 48 (4): 493–498.

Kelso, G. J, Stuart, W.D, Richter, R. J, Furlong, C. E, Jordon, TJ, Harmony, J.A.K. (1994). Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. Biochemistry. 33: 832-9.

Köse, E., Uysal, K. (2008). Cinsi Olgunluğa Erişmemiş Pullu Sazan (*Cyprinus Carpio*)'ların Kas, Deri ve Solungaçlarındaki Ağır Metal Akümülyasyon Oranlarının Karşılaştırılması. D.P.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Aralık 17. Sayı.

Kurban, S., Akpınar, Z., Mehmetoğlu, İ. (2010). Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Genel Tıp Derg. 20(1):13-17.

Kwong, T.C. (2002). Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. Ther Drug Monit. 24:144-9.

La, Du B. N, Aviram, M, Billecke, S, Navab, M, Primo-Parmo, S, Sorenson, RC, et al. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. Chem. Biol. Interact. 119-120;379-88.

Li, Z., Zlabeka, V., Grabica, R., Lia, P., Machovaa, J., Veliseka, J., Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on the antioxidant defense system and Na⁺-K⁺-ATPase activity in brain of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology. 98: 297–303.

Liedias, F., Rangel, P., Hansberg, W. (1998). Oxidation of catalase by singlet Oxygen. J. Biol. Chem. 273:10630-10637.

Livingstone, D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Marine Pollution Bulletin. 42: 656–666.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: A review. J. Sci. Food Agric. 86: 2046-2056.

Mackness, B., Mackness, M.I, Arrol, S, Turkei, W, Durrington, P.N. (1998). The effect of the human paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein oxidative modification. FEBS letters. 423:57-60.

MEB. Milli Eğitim Bakanlığı. (2012). Pestisitler 850CK0054, Ankara.

Mercan, U. (2004). Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. YYÜ Vet. Fak. Derg. 15 (1-2):91-96.

Miller, G.T., 2002. Living in the Environment (12th Ed). Belmont: Wadsworth/Thomson Learning. ISBN 0-534-37697-5.

Moretto, A. (1998). Experimental and clinical toxicology of anticholinesterase agents. Toxicol Lett. 28:509-13.

Narbonne, J.F., Aarab, N., Clerandeau, C, Daubeze, M., Narbonne, J., Champeau, O. And Garrigues, P. (2005). Scale of elassification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. Biomarkers, 10 (1): 58-71.

Oruç, E. Ö., Sevgiler, Y., Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 137: 43–51.

Ozan, E., Koyutürk, L., Sapmaz, T.(2004). Böbrek İskemi-Reperfüzyon Hasarında Antioksidan Olarak Prostoglandin E1 (PGE1) Kullanımının İncelenmesi: Deneysel Çalışma Fırat Tıp Dergisi. 9(3): 67-71.

Öden, S., (2009). Pestisitler ve Pestisitlerin Çevre Etkileri (Online). www.tutuneksper.org.tr/yayin/bulten/bulten77/pestisitler.htm (31 Aralık 2009).

Öğüt, S., Atay, E. (2012). Yaşlılık ve oksidatif stres. Derlemeler S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 19(2)/68-74.

Öncü, M. Gültekin, F., Karaöz, E., Altuntaş, İ., Delibaş, N. (2002). Klorprifos-Etil Tarafından Oluşturulan Oksidatif Hasarın Sıçan Karaciğerine Etkileri. T. Klin. Tıp Bilimleri. 22:50-55.

Özkaya, G., Çeliker, A., Koçer-Giray, B. (2013). İnsektisit zehirlenmeleri ve Türkiye’deki durumun değerlendirilmesi. Türk Hij. Den. Biyo. Derg. 70(2): 75 -102.

Papa, S., Skulachev, V.P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* 174: 305–319.

Rodrigo L, Hernandez F, Caballero L, Gil F, Pla A. (2001). Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. Implications for its physiological role. *Chem. Biol. Interact.* 137: 123-137.

Sorenson, R.C, Bisgaier, C.L, Avira, M, Hsu C, Billecke, S, La, Du B.N. (1999). Human serum paraoxonase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids; apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:2214-2225.

Stegeman, J. J., Lech, J.J., (1991). Cytochrome P-450 Monooxygenase systems in aquatic species. Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure, *Environmental Health Perspectives.* 90:101-109.

Stephen, B., Kyle, L., Yong, X., Cynthia, A., Donald, E., Earl, F., James, E. (1997). Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. *Annals of Clinical and Laboratory Science.* 27(3) : 196-208.

Şener. G, Yeğen Berrak. Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi.* 22: 5-13.

Şenses, S. V., Özyazgan, S., Akkan, A.G. (1999). Serbest Oksijen radikalleri-1: Vücuttaki Antioksidan Sistemler. *Türk Aile Hek. Derg.* 3(1-2):5-11.

Tanove, N., Matsumura, H., Atsuta, M. (1998). Prospectives of Four Composite veneering Materials Polymerized With Different Laboratory Photo-curing Units. *J. Oral Rehabil.* 25,358-364

Timchalk, C., Busby A, Campbell, J. A, Needham, LL, Barr, D. N.(2007).Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylthiophosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat. *Toxicology.* 237, 145-157.

Tulunoğlu, Ö. (1999). Serbest radikaller ve Antioksidanlar. Derlemeler GÜ.Dış hekimliği derg. 16 (1): 43-50.

USEPA, 1986. Environmental Quality Criteria For Water, EPA Report No:440/5-86-001, USEPA, Washington, DC.

Uslu, H., Atila, G., Ersan, Y., Özden, Z. (2016) . İsrail Sazanı (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) Balıklarına Uygulanan Cypermethrin'in Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkileri. GÜFBED/GUSTIJ. 6 (1): 41-46.

Uysal, S., Akyol, S., Hasgöl, R., Armutcu, F., Yiğitoğlu, R. (2011). Çok yönlü bir enzim: Paraoksonaz. Fatih Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA.Yeni Tıp Dergisi. 28(3):136-141.

Ünver, Z. A., Koldemir, M., Duman, B. S., Sesal, N. C., Kayhan, F. E.(2014). Zebra Balıklarında (*Danio rerio*) ağır metal indüksiyonunun oksidatif stres parametrelerine etkisi. J. Fisheries Sciences. 8(3): 199-207.

Üstündağ, B., Bahçecioğlu, İ. B., Şahin, K., Gülcü, F., Düzgün, S., Özercan, İ. H., Gürsu, M. F. (2005). Soy İzoflavonların Karbon Tetra Klorür (CCL₄) bağlı Karaciğer Hasarı Plazma Paraoksonaz ile Arilesteraz Aktivite Düzeylerine Olan Etkisi. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi. 19(4), 263-271.

Vural, N. (1996). Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 73:342-373.

Yücel, Ü. (2007). Pestisitlerin İnsan ve Çevre Üzerine Etkileri. Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü. Ankara. (Online) <http://www.dogainsanisbirligidernegi.org.tr/makaleler/pestisitler.doc> (17 Ekim 2009).

WHO: Organophosphorus Pesticides. Erişim (<http://www.Who.org>). Erişim Tarihi:21.03.2016.

Van Himbergen, T. M., Van Tits, L. J. H, Roest, M., Stalenhoeft, A.F.H. (2006). The story of PON1: how an organophosphate hydrolyzing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. Neth J Med. 64(2):34-8.

Villarroel, F., Basti'as, A., Casado, A., Amthauer, R., Concha, I.M. (2007). Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: Evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 197-209.

Zaobornyj, T., Valdez, LB., La Padula, P., Costa, L.E., Boveris, A. (2005). Nitric Oxide. 13(1):62.

