

T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MALATYA YÖRESİNDE YAYGIN KULLANILAN SEÇİLMİŞ İKİ
İNSEKTİSİDİN *Danio rerio* (Zebrabalığı) ÜZERİNE SUBLETAL ETKİLERİ
VE TOKSİK ETKİLERİN ZAMANA BAĞLI GERİ DÖNÜŞÜRLÜĞÜ**

VOLKAN KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA

EKİM 2014

Tezin Başlığı: **MALATYA YÖRESİNDE YAYGIN KULLANILAN SEÇİLMİŞ İKİ
İNSEKTİSİDİN *Danio rerio* (Zebrabalığı) ÜZERİNE SUBLETAL
ETKİLERİ VE TOKSİK ETKİLERİN ZAMANA BAĞLI GERİ
DÖNÜŞÜRLÜĞÜ**

Tezi Hazırlayan: **Volkan KORKMAZ**

Sınav Tarihi: 24.10.2014

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Tez Danışmanı: **Prof. Dr. Murat ÖZMEN**
İnönü Üniversitesi

Eş Danışman: **Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ**
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Erhan ÜNLÜ
Dicle Üniversitesi

Prof. Dr. Dilek ASMA
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Didem GÖKÇE
İnönü Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Malatya Yöresinde Yaygın Kullanılan Seçilmiş İki İnsektisidin *Danio rerio* (Zebrabalığı) Üzerine Subletal Etkileri ve Toksik Etkilerin Zamana Bağlı Geri Dönüşürlüğü**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.



Volkan KORKMAZ

ÖZET

Doktora Tezi

MALATYA YÖRESİNDE YAYGIN KULLANILAN SEÇİLMİŞ İKİ İNSEKTİSİDİN *Danio rerio* (Zebrabalığı) ÜZERİNE SUBLETAL ETKİLERİ VE TOKSİK ETKİLERİN ZAMANA BAĞLI GERİ DÖNÜŞÜRLÜĞÜ

Volkan KORKMAZ
İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
103+ x Sayfa

2014

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Bu çalışmada, erişkin zebrabalığının (*Danio rerio*, (Hamilton 1822)) organofosfat grubu pestisitlerden fosalon ve piretroit grubu pestisitlerden sipermetrinin ve bunların karışımlarına subletal dozlarda maruz kalmalarının toksik etkileri ve bu etkilerin geri dönüşürlüğünün çeşitli biyokimyasal belirteçler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 96 saatlik test sonucunda fosalon ve sipermetrinin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) değerleri sırasıyla 2.254 mg AI/L ve 0.0144 mg AI/L olarak tespit edilmiştir. Seçilen pestisitlerin subletal uygulama konsantrasyonları 96 saatlik LC_{50} değerine göre belirlenmiştir. *D. rerio* bireyleri fosalon ve sipermetrinin ayrı ayrı $LC_{50/2}$, $LC_{50/4}$ ve $LC_{50/10}$ konsantrasyonlarına ve bu konsantrasyonların ikili karışımlarına (1:1) 96 saatlik statik yenilemeli test sisteminde maruz bırakılmıştır. 96 saat'lik subakut toksisite testi sonunda balıklar normal yaşam koşullarına alınmış ve tekrar düzenli olarak beslenmeye devam edilmiştir. Ortam taze su ile gün aşırı yenilenmiş ve balıklardan 10 ve 20 gün sonunda alınan örnekler, 96 saat uygulama grubu ile birlikte değerlendirilmiştir. Pestisitlerin etkileri ve geri dönüşüm sürelerinin oluşturduğu değişimleri tespit etmek amacıyla, glutatyon S-transferaz (GST), karboksilesteraz (CaE), asetilkolinesteraz (AChE), glutatyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), laktat dehidrogenaz (LDH), alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST) enzimleri biyobelirteç olarak değerlendirilmiştir.

Her iki pestisite ayrı ayrı veya farklı kombinasyonlarda pestisit karışımlarına maruz kalan balıklarda seçilen biyobelirteç enzimlerin önemli düzeyde aktivasyon veya inhibisyona uğradığı saptanmıştır. Sonuçlar, seçilen pestisitlerin çok düşük konsantrasyondaki subletal dozların dahi *D. rerio* üzerinde toksik potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda GST, CaE, AChE ve GR enzimlerin aktivitelerinde görülen değişimler kullanılan pestisitlerin ve karışımlarının subletal konsantrasyonlarının toksik risklerini gösteren en önemli biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır. Diğer taraftan, balıklarda pestisite maruz kalmanın sonlanmasını takip eden 20 günlük geri dönüşüm periyodunun enzim aktivitelerinin kontrol grubu düzeylerine dönmesinde yetersiz olduğunu, organizmaların doğal ortamlarda bu gibi pestisitler ve karışımlarına maruz kaldıklarında daha uzun geri dönüşüm sürelerine ihtiyaç duyabileceklerini göstermiştir. Ayrıca sonuçlarımız, *D. rerio*'nun sucul ekosistemlerde, pestisit kirliliğinin ve toksik etkinin geri dönüşürlüğünün belirlenmesi için kullanışlı bir test organizması olduğunu ve seçilen biyokimyasal belirteçlerin de pestisit toksisitesini iyi bir şekilde yansıttığını göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Sipermetrin, Fosalon, Geri Dönüşüm, *Danio rerio*, Biyobelirteç.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE SUBLETHAL EFFECTS OF WIDELY USED TWO INSECTICIDES IN MALATYA REGION ON *Danio rerio* (Zebrafish) and TIME DEPENDENT RECOVERY OF THEIR TOXIC EFFECTS

Volkan KORKMAZ

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
103+ x pages

2014

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

This study was aimed to determination of toxicity and also recovery of toxic effects using various biochemical markers on zebrafish (*Danio rerio*, (Hamilton 1822)) adults who were exposed to phosalone and cypermethrin pesticides or their mixtures as an organophosphate or pyrethroid groups, respectively. Due to this, LC₅₀ values of 96h exposure to the selected pesticides were calculated as 2.254 mg AI/L for phosalone and 0.0144 mg AI/L for cypermethrin and the application concentrations of selected pesticides were determined according to the calculated LC₅₀ values. Fish were exposed to the pesticides separately or their mixtures using LC_{50/2}, LC_{50/4} and LC_{50/10} concentration with the binary mixtures (1:1) were used for 96 hour static renewal test system. After the 96 h exposure periods, some fish samples were stored for further assays in ultra-freezer, but remaining were transferred into clean tanks and they were continued to feed daily during the study for recovery studies. The media in the tanks were changed every other day and remaining fish were collected on day 10 or 20 for biochemical assays to compare 96 h exposed samples with together. For this aim, glutathione S-transferase (GST), carboxylesterase (CaE), acetylcholinesterase (AChE), glutathione reductase (GR), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were assayed as biochemical markers.

It was determined for exposed fish in both pesticide or mixture groups that the selected enzyme markers were significantly activated or inhibited by the pesticide exposures. Also, the results show that *D. rerio* samples were affected by even in very low concentrations of sublethal exposures of the pesticides. The GST, CaE, AChE and GR were represented the toxicity of pesticide exposures which are the most suitable biomarkers for evaluating the toxicity. On the other hand, results show that 20 days of recovery period after the termination of pesticide exposure was not enough to recovery of enzyme activities in normal levels such as in control groups and it was also showed that the recovery period may need more time than 20 days in their natural habitat if the fish was exposed to such pesticides. This study also represented that *D. rerio* is suitable test organisms to determine pesticide pollution and recovery of the toxic effects of used pesticides in aquatic systems and the selected biochemical markers are the suitable to determine pesticide toxicity on these organisms.

KEY WORDS: Cypermethrin, Phosalone, Recovery, *Danio rerio*, Biomarker.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve çalışma süresince karşılaşılan sorunların çözümünde öneri ve desteklerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Çalışmalarım süresince uyarı ve önerileriyle bana sürekli destek olan Tez İzleme Komitesindeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Didem GÖKÇE'ye;

Çalışmalar süresince öneri ve destekleriyle bana ağabeylik yapan değerli ikinci danışman hocam Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye;

Her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili ANNEM'e;

Bu çalışmaya maddi olarak destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2012/171);

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.2. Pestisitler	2
1.2.1. Piretroitler	2
1.2.1.1. Sipermetrin	3
1.2.2. Organofosfatlar	3
1.2.2.1. Fosalon	5
1.3. Biyoindikatörler	6
1.3.1. Sucul Ekosistemlerin Biyoindikatörü Olarak <i>Danio rerio</i>	6
1.3.2. Zebrabalıklarının Yaşam Alanları	6
1.3.3. <i>Danio rerio</i> Sistematığı	7
1.3.4. <i>Danio rerio</i> 'nun Morfolojisi ve Anatomisi	8
1.3.5. <i>Danio rerio</i> 'nun Üreme Davranışı	9
1.3.6. <i>Danio rerio</i> 'nun Beslenmesi	10
1.4. Biyolojik Geri Dönüşürlük Testleri	11
1.5. Toksisitenin Değerlendirilmesi Amacıyla Kullandığımız Biyobelirteçler	11
1.5.1. Biyotransformasyon	11
1.5.1.1. Glutasyon S-transferaz	12
1.5.1.2. Glutasyon Peroksidaz	13
1.5.1.3. Katalaz	14
1.5.1.4. Glutasyon Redüktaz	15
1.5.2. Esterazlar	16
1.5.2.1. Karboksilesteraz	16
1.5.2.2. Asetilkolinesteraz	17
1.5.3. Laktat dehidrogenaz	20
1.5.3.1. Aminotransferazlar	21

1.5.3.1.1.	Alanin Aminotransferaz	21
1.5.3.1.2.	Aspartat Aminotransferaz	21
2.	KAYNAK ÖZETİ.....	23
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1.	Çalışmada Kullanılan Pestisitler.....	33
3.2.	<i>Danio rerio</i> Bireylerinin Sağlanması.....	33
3.3.	Toksisite Testlerinin Uygulanması	33
3.3.1.	Pestisitlerin LC ₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	33
3.3.2.	Subakut Toksisite Deneyleri.....	34
3.4.	Ortam pH'sının Saptanması	35
3.5.	Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	36
3.5.1.	Balıkların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri	36
3.5.2.	Glutasyon S-transferaz Aktivitesi	36
3.5.3.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	37
3.5.4.	Karboksilesteraz Aktivitesi	37
3.5.5.	Asetilkolinesteraz Aktivitesi	37
3.5.6.	Katalaz Aktivitesi	38
3.5.7.	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	38
3.5.8.	Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi.....	38
3.5.9.	Aspartat Aminotransferaz Aktivitesi	39
3.5.10.	Alanin Aminotransferaz Aktivitesi.....	39
3.6.	Toplam Protein Miktarı Tayini.....	39
3.7.	İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar	40
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	42
4.1.	96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	42
4.1.1.	96 Saatlik LC ₅₀ ve NOAEC Değerleri	42
4.1.2.	96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri	42
4.2.	96 Saatlik Sipermetrin Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	43
4.3.	Sipermetrin Toksisitesinde 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresinin Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	45
4.4.	96 Saatlik Fosalon Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	50

4.5.	Fosalon Toksisitesinde 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresinin Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	51
4.6.	96 Saatlik Pestisit Karışımlarının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi ..	56
4.7.	Pestisit Karışımlarının 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresi Sonunda Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	58
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6.	KAYNAKLAR.....	93
	ÖZGEÇMİŞ.....	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Normal ve piretroit uygulamasında iyon kanallarının durumu	3
Şekil 1.2.	Sipermetrin insektisitinin kimyasal yapısı	3
Şekil 1.3.	OP etki mekanizması	4
Şekil 1.4.	Fosalon insektisitinin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.5.	Dişi ve Erkek zebrabalıkları	8
Şekil 1.6.	<i>Danio rerio</i> 'nun gelişim evreleri	10
Şekil 1.7.	GPx katalitik döngüsü	14
Şekil 1.8.	GR'nin GSH metabolizmasındaki yeri	16
Şekil 1.9.	AChE'nin impuls iletimini sonlandırma basamakları	18
Şekil 1.10.	Asetilkolinin parçalanması	19
Şekil 1.11.	AChE'nin yapısı	20
Şekil 1.12.	Laktat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon	20
Şekil 1.13.	AST reaksiyon metabolizması	22
Şekil 3.1.	BSA standart eğrisi	40
Şekil 5.1.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GST enzim aktivitesi.....	69
Şekil 5.2.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GST enzim aktivitesi.....	69
Şekil 5.3.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında CaE enzim aktivitesi	71
Şekil 5.4.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında CaE enzim aktivitesi	71
Şekil 5.5.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi	73
Şekil 5.6.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi	73
Şekil 5.7.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi	74
Şekil 5.8.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi.....	75
Şekil 5.9.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi	76
Şekil 5.10.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi	77
Şekil 5.11.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi.....	78
Şekil 5.12.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi	78
Şekil 5.13.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi	79
Şekil 5.14.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi.....	80
Şekil 5.15.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi.....	80
Şekil 5.16.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi.....	81
Şekil 5.17.	96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi.....	81

Şekil 5.18.	96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi	82
Şekil 5.19.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GST enzimaktivitesi	85
Şekil 5.20.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında CaE enzimaktivitesi	86
Şekil 5.21.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi	86
Şekil 5.22.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi	88
Şekil 5.23.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi	88
Şekil 5.24.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi	89
Şekil 5.25.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi	90
Şekil 5.26.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi	91
Şekil 5.27.	96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi	91

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Karışım kombinasyonları.....	35
Çizelge 4.1. Pestisitlerin 96 saatlik LC ₅₀ ve NOAEC değerleri.....	42
Çizelge 4.2. 96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.....	43
Çizelge 4.3. 96 saatlik çalışmalarda karışımlardan elde edilen ortalama pH değerleri.....	43
Çizelge 4.4. Sipermetrin uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi.....	49
Çizelge 4.5. Fosalon uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi	55
Çizelge 4.6. 96 saatlik karışım uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi	62
Çizelge 4.7. Pestisit karışım uygulamasının 10 günlük geri dönüşüm süresinin enzim aktivitelerine olan etkisi	63
Çizelge 4.8. Pestisit karışım uygulamasının 20 günlük geri dönüşüm süresinin enzim aktivitelerine olan etkisi	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ACTI	Asetilkolin iodid
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
BChE	Bütirilkolinesteraz
BSA	Sığır serum albümini
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
ChE	Kolinesteraz
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GR	Glutasyon redüktaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
GSSG	Okside glutasyon
IU	Ünite
KCl	Potasyum klorür
LC ₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
LOAEC	Olumsuz etki görülen en düşük konsantrasyon
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaN ₃	Sodyum azid
NOAEC	Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon
OP	Organofosforlu
PCB	Poliklorlu bifenil
PMSF	Fenilmetilsülfonilflorür
PNPA	<i>P</i> -nitrofenol asetat
ROS	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dismutaz
FSL	Fosalon
SPR	Sipermetrin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Tarımsal üretimin ve tekniklerin hızla gelişmesi beraberinde çeşitli çevresel sorunları ortaya çıkarmıştır. FAO yayınladığı bir raporda dünyada pestisit üretiminin 3 milyon ton civarında olduğuna dikkat çekmektedir. Pestisit kullanımının yaygın hale gelmesi ise ekosistem dengelerinin bozulmasına yol açan etmenlerin başında gelen nedenlerden birini oluşturmaktadır (FAO, 2010).

Geçmiş yıllarda üretilen bazı pestisitler çevrede çok uzun süre bozulmadan kalabilecek kararlılıktaydı. Örneğin; DDT'nin toprakta yarı ömrü 22-30 yıl, mireks'in yaklaşık 12 yıldır. Toksafen 14 yıldan daha fazla, dieldrin 7 yıldan, klordekon ise 30 yıldan daha fazla toprakta kalabilmektedir. Bu pestisitlerin suda yavaş çözünmeleri, organizmaların yağ dokularında birikmesine neden olmaktadır. Bu birikim hem insanlarda hem de diğer canlılarda toksik yanıtların oluşmasına yol açmaktadır. Özellikle bu tür pestisitlerin sıklıkla kullanıldığı bölgelerde canlı dokularında çok önemli seviyelerde pestisit varlığının tespit edildiği vurgulanmıştır (PAN, 2010).

Toprağa geçen kimyasallar çeşitli yollarla sucul ortamlara ulaşırlar. Bu yolların en başında yağmur suları gelmektedir. Su kaynaklarına taşınan kimyasallar öncelikli olarak sucul ortamda yaşayan canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Canlı vücudunda birikime neden olan bu kimyasallar besin zincirinin en üst halkasına kadar ulaşabilmektedirler. Özellikle sanayileşmiş toplumlarda ve metropol kentlerde sucul kaynakların kirliliği en üst düzeydedir ve bu koşullar toplumları kirlilikle mücadelede daha etkin yollar bulmaya zorlamaktadır (Ünal, 2010).

Amacı tarımsal faaliyetlerde verimliliği arttırmak olan pestisitlerin doğal yaşama ve insan sağlığına da olumsuz etkileri sürekli gündemdedir. Çünkü pestisitlerin hedef olmayan canlılara da etki etmesi ve biyoçeşitliliğin azalmasındaki rolü pestisit kullanımının başlıca sorunudur. Akut ve kronik olarak pestisite maruz kalmak, çeşitli sağlık problemlerine ve hastalıklara neden olmaktadır. Özellikle çiftçiler, tarım işçileri ve aileleri günlük olarak sürekli zararlı kimyasallar ile temas halindedir. Buna bağlı olarak özellikle çocukların beyin gelişimi ve sinir sistemi yetişkinlere oranla daha fazla etkilenmektedir. Özellikle çiftçilik gibi risk taşıyan meslek mensupları uzun süreli düşük doz pestisite maruz kalmayla karşı karşıyadır.

Bu bireyler Parkinson ve Alzheimer hastalıklarına daha fazla yakalanmaktadırlar. Bazı pestisitlerin endokrin bozucu özellikleri nedeniyle hormonal bozukluklara bağlı hastalıklara neden olduğu da bilinmektedir. Hamilelerin pestisitlere maruz kalması; düşüklere, fetüsün sinir sistemi gelişim bozukluklarına neden olmaktadır (PAN, 2010).

Bu çalışmada yöremizde yaygın kullanılan sipermetrin ve fosalon içerikli pestisitlerin ve bunların karışımlarının subletal konsantrasyonlarının toksik etkilerinin saptanması ve toksik etkinin geri dönüşürlüğünün tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla toksisiteyi ortaya koyabilecek biyokimyasal belirteçler seçilerek, toksik etkinin ve toksik etkinin zamana bağlı geri dönüşürlüğünün değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

1.2. Pestisitler

1.2.1. Piretroitler

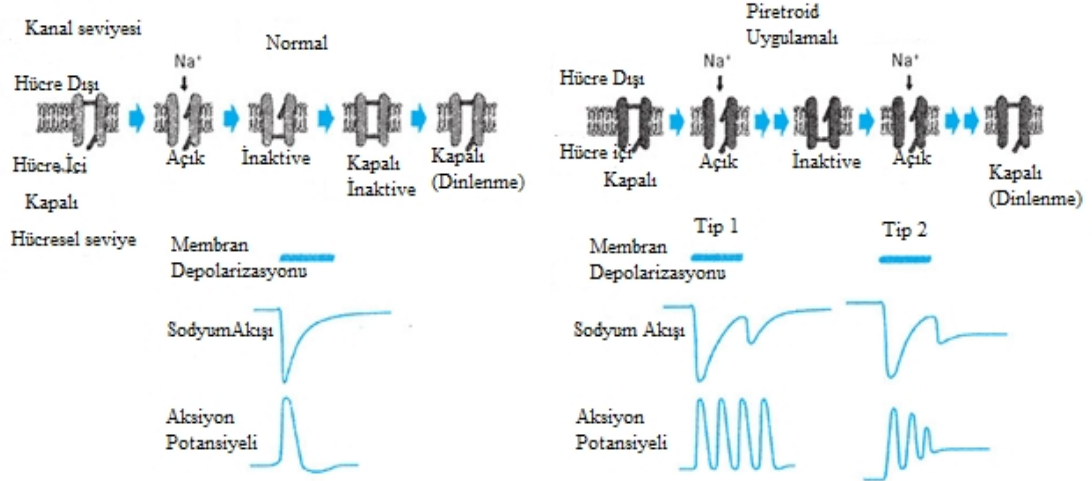
Piretroitler, *Chrysanthemum* bitkisinin çiçeklerinden üretilen doğal piretrinlere benzer organik bileşiklerdir ve günümüzde oldukça yaygın kullanım alanlarına sahip insektisitlerdir (Robert, 2002). Bu insektisitler, böceklerde oldukça etkilidir, atmosfere karıştığında güneş ışığının etkisiyle hızla parçalanır ve böylece yer altı su kaynaklarına da önemli bir etkide bulunmazlar (EPA, 2002).

Yüksek etkileri, kolay yıkılabilmeleri, bu insektisitlerin organoklorlu, fosforlu ya da karbamat insektisitlere göre daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur (Aydın-Sinan vd., 2012).

Piretroitler, iki gruba ayrılırlar; bunlar, tip 1 ve tip 2 piretroitlerdir. Bu tipler arasındaki temel farklılık, alkol gruplarındaki α karbon atomuna bağlı siyano grubunun olup olmamasıdır. Tip 2 piretroitler siyano grup taşırlar (Soderlund vd., 2006).

Piretroitler, voltaj kapılı sodyum iyon kanalları üzerinde etkili olurlar (Narahashi, 1996). Piretroitler, sodyum kanallarının α alt ünitelerine bağlanırlar ve böylece kanalın aktivasyon ve inaktivasyon hızını yavaşlatırlar (Şekil 1.1). Kanalin daha fazla açık kalması daha fazla sodyum iyon geçişi anlamı taşır ki, bu da sürekli uyarım anlamına gelir (Shafer vd., 2005).

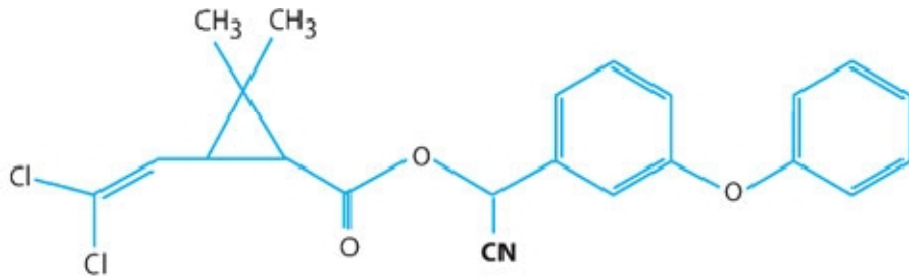
Genel olarak tip 2 piretroitler, tip 1'e göre sodyum kanallarının inaktivasyonunu daha uzun sürede gerçekleştirir (Ray vd., 2006).



Şekil 1.1. Normal ve piretroit uygulamasında iyon kanallarının durumu (Shafer vd., 2005)

1.2.1.1. Sipermetrin

Sipermetrin, yaygın kullanılan ve hızlı etki gösteren sentetik piretroit grubu bir insektisittir (Şekil 1.2). Toprakta çok hızlı bir şekilde parçalanırken uygulandığı esnada etkisini çabuk gösterir. Direkt güneş ışığına maruz kalma, su ve oksijenle teması bozulma sürecini hızlandırır (NPIC, 2014).



Şekil 1.2. Sipermetrin insektisitinin kimyasal yapısı (Klaasen, 2008)

1.2.2. Organofosfatlar

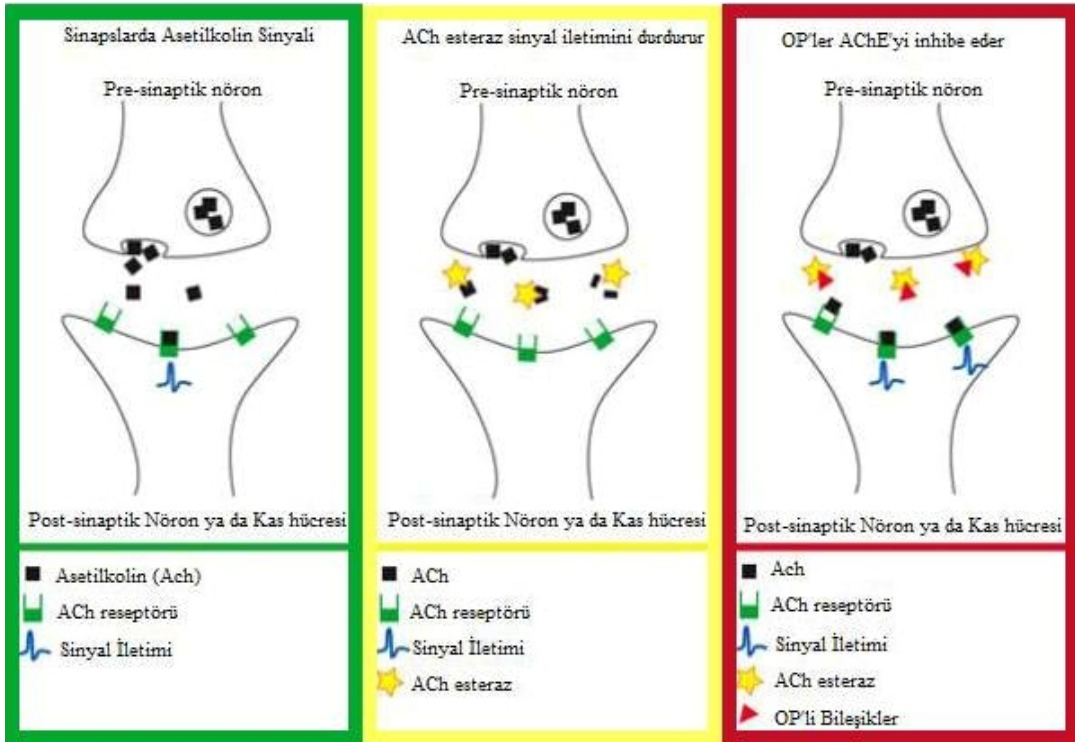
Organofosfatlı bileşikler, insektisit, akarisit, helmintisit ve nematosit olarak kullanılabilen oldukça tehlikeli ve toksik kimyasallardır (Rahul, 2014). 2. Dünya Savaşı sırasında, sarin, soman, tabun gibi organofosfat içerikli bileşiklerin üretimi hızlanmış ve savaşta kullanılabilecek kimyasal silah haline getirilmişlerdir. Bu bileşikler sinir gazı olarak kullanılmış ve geniş kitlelerin ölümüyle sonuçlanan tablolar ortaya çıkmıştır (Morita, 1995). Organofosfatlar, Çevre Koruma Örgütü

(EPA) tarafından insanlar, yabanıl yaşam ve diğer canlılar için yüksek akut toksik maddeler olarak sınıflandırılmıştır (EPA, 2012).

Bu gruptaki bileşikler, zirai mücadele amaçlı olarak çok yaygın biçimde kullanılmaktadırlar. Bunun sonucu olarak su kaynakları etkilenmekte, sucul yaşam tehdit edilmekte ve insan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir (Yuan vd., 2014).

Organofosfatlı bileşiklerin ilk hedefi asetil kolin esteraz (AChE) enzimidir ve bazı B-esterazlar, asetilkolinin hidrolize olmasında fizyolojik rol oynarlar (Şekil 1.3). Asetil kolin, merkezi ve çevresel sinir sisteminde görev alan asıl nörotransmitterdir (Marrs, 1996). Asetilkolin, kolinerjik sinir uçlarından salınır ve sadece AChE vasıtasıyla hidrolize olur. Organofosfatlı kimyasallar (OP) AChE'yi inhibe eder, böylece kolinerjik sinapslarda asetil kolin birikmeye başlar. Bunun sonucunda, nikotinik ve muskarinik reseptörlerde çok yüksek seviyede uyarılma olur. Bu uyarılma, 'kolinerjik sendrom' olarak adlandırılır (Klaasen, 2008).

AChE inhibisyonunda temel mekanizma, OP'li bileşiklerin enzimin aktif merkezinde bulunan serin ile reaksiyona girmesidir. Bu reaksiyon bir kez gerçekleşikten sonra enzim inhibisyonu ortaya çıkar ve bu inhibisyonun geri dönüşümü çok düşük düzeyde gerçekleşir (Güngördü, 2007).

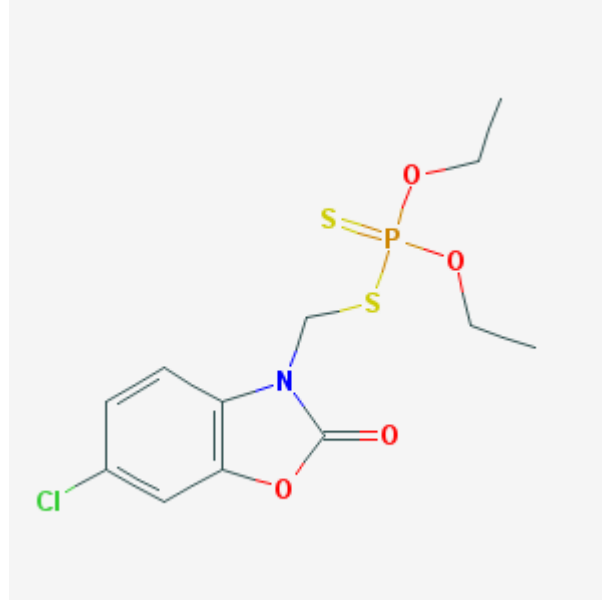


Şekil 1.3. OP etki mekanizması (Washington, 2014)

1.2.2.1. Fosalon

Fosalon, (S-[(6-Kloro-2-okso-1,3-benzoksazol-3(2H)-yl)metil]O,O-dietilforodithiyat); patates, pamuk, bahçe bitkileri, yaprak döken meyve ağaçları için insektisit ve akarist olarak ilk defa 1963 yılında Rhone-Poulenc şirketi tarafından tanıtılmıştır (Hayes, 1990).

Fosalon, bir organofosfat esteridir ve kolinesteraz inhibisyonunda zayıf bir potansiyeli vardır (Şekil 1.4). Fosalonu daha güçlü kılan özelliği oksijen analoglarına (okson türevleri) dönüşebilmesidir. Bu analoglar fosalonun inhibisyon etkisini 2-3 kat arttırmaktadır. Hayvan metabolizmalarında fosalon hızlı bir şekilde yıkıma uğrayarak, toksik olmayan ürünlere dönüşmektedir. Fosalon, toprakta da hızlıca ayrışmaktadır (Inchem, 2014).



Şekil 1.4. Fosalon insektisitinin kimyasal yapısı (EPA, 2014)

Fosalon, pH 5-7 aralığında stabildir fakat pH 9'da hidrolize olur ve yarı ömrü ortalama 9 gün kadardır. Diğer organizmalarla kıyaslandığında sucul canlılarda daha yüksek toksik etki göstermektedir (EPA, 1987).

1.3. Biyoindikatörler

Gelişen dünyada insan faaliyetleri neticesinde çevreye çok sayıda ve çeşitlilikte atık bırakılmaktadır. Bu atıkların zararının ölçülebilmesi için biyoindikatörler gün geçtikçe daha fazla önem kazanmaktadır (Kazancı vd., 1998 ve Van der Oost vd., 2003).

Biyoindikatörlerin temel amacı bir ekosistem içindeki organizmanın veya topluluklarının sistem içerisindeki sağlık durumlarının incelenmesine ve varsa bir problemin tespit edilmesine yardımcı olmak ve oluşabilecek risklerin önüne geçmektir. Herhangi bir tehdide karşı oluşabilecek yanıt çok çeşitlilik gösterebilir, bunlar fizyolojik, moleküler, hücresel tepkiler olabileceği gibi, tamamıyla davranış değişikliklerini de kapsayabilir (Van der Oost vd., 2003 ve Karaca, 2010).

1.3.1. Sucul Ekosistemlerin Biyoindikatörü Olarak *Danio rerio*

Son yirmi yıldan beri zebrabalıkları genetik ve gelişim biyolojisi konularında önde gelen model organizmalardan biri olarak ortaya çıkmıştır (Fishman, 2001). İlerleyen zamanlarda insan sağlığı ve terapötik ilaçların araştırılmasında da kullanımı son derece popüler hale gelmiştir (Penberthy vd., 2002).

Zebrabalıklarının boylarının küçük oluşu, hızlı gelişimleri, erken gelişim dönemlerinde transparan oluşları gibi öne çıkan özellikleri sayesinde genetik araştırmalar ve insan genetik çalışmaları konularında bu canlıları favori yapmıştır (Lamason, 2005).

Deneyisel model olarak kullanılan zebrabalıkları, çalışmalarda ekonomik anlamda kolaylıklar sağlamıştır ve geniş alanlarda kullanımının yaygın hale gelmesiyle maliyetler de aynı oranda düşmüştür. Diğer balık çalışmalarıyla karşılaştırıldığında nispeten ekonomik oluşu bu canlılarla çalışma yapılmasını yaygınlaştırmıştır (Lawrence, 2007).

1.3.2. Zebrabalıklarının Yaşam Alanları

Zebrabalıkları Güney Asya kökenlidir. Hindistan, Bangladeş, Nepal, Myanmar ve Pakistan gibi çok geniş bir coğrafyaya dağılmışlardır (Lawrence, 2007).

Adı geçen bu bölgeler muson iklimine sahiptir. Yağmurlu geçen ve geçmeyen zaman aralıkları bu canlıların yaşayacakları habitatları tercih etmede en önemli

etkendir. Zira yağmur suyu, su rezervlerinin kimyasında değişikliğe neden olabildiği gibi, kaynaklardaki su bolluğunu da etkilemektedir. Zebrabalıkları bu tip bölgelerde göç edebilmekte, pirinç tarlaları, göletler, nehirlerde yaşamaktadırlar (Menon, 1999 ve Bhat, 2003).

Yayılış alanlarının bilinmesi ve kontrol edilmesi bu canlıların laboratuvar koşullarında yaratılacak ortamların dizayn edilmesini de kolaylaştırmıştır. Yapılan dış gözlemler ve analizler ışığında bu canlıların çok berrak ortamları tercih ettiği bilinmektedir (Buttner vd., 1993).

Zebrabalığının genom yapısının, diğer omurgalı canlılar ve insan genomuna benzerlik göstermesi, metabolik faaliyetlerin ve embriyolojik gelişim süreçlerinin oldukça benzer olması ve embriyonal gelişimin mikroskop altında kolaylıkla izlenebilmesi bu canlıların model organizma olarak kullanılmasında önde gelen sebeplerdendir (Din, 2002 ve Stern vd., 2003).

1.3.3. *Danio rerio* Sistematığı

Zebrabalığının sistematikteki yeri aşağıda gösterilmiştir (ITIS, 163699):

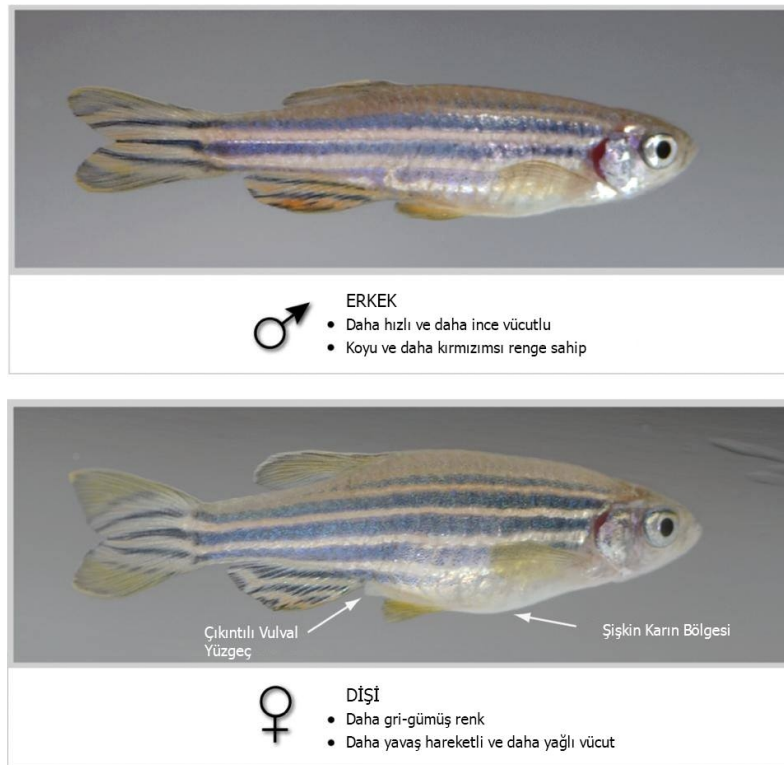
Domain:	Eukaryota
Alem:	Animalia
Alt alem:	Bilateria
İnfra alem:	Deuterostomia
Şube:	Chordata
Alt şube:	Vertebrata
İnfra şube :	Gnathostomata
Süper sınıf:	Osteichthyes
Sınıf:	Actinopterygii
Alt sınıf:	Neopterygii
İnfra sınıf:	Teleostei
Üst takım:	Ostariophysi
Takım:	Cypriniformes
Süper aile :	Cyprinoidae
Aile:	Cyprinidae
Cins:	<i>Danio</i> (Hamilton,1822)
Tür:	<i>Danio rerio</i> (Hamilton,1822)

1.3.4. *Danio rerio*'nun Morfolojisi ve Anatomisi

Bu canlılara zebrabalığı denmesindeki temel sebep, vücutlarının yan kısımlarında yatay ve kuyruk yüzgecinin sonuna kadar uzanan 5-9 adet mavi renkli çizgilerin bulunmasıdır. Ağız tipi dorsaldır ve vücut şekilleri fuziform olup yanlardan basıktır. Erkek bireylerde mavi çizgiler arasında sarı-altın renkli çizgiler bulunurken, dişi bireyler erkekler nazaran daha iri ve mavi çizgilerin arasında sarı-altın yerine gümüşü çizgilere sahiptir (Şekil 1.5). Yetişkin dişilerde genital papilla mevcuttur ve bu yapı anal yüzgecin önünde yer alır. Genel boy uzunlukları 4-5 cm civarındadır (Akan, 2012).

Ergin hale gelmemiş bireylerde eşey ayrımı yapmak çok zordur, fakat erginleşmemiş erkek bireylerin dişiye kıyasla anal yüzgeçlerinin daha büyük olması ve dişilerdeki genital papilla yapısı bu ayrımı kolaylaştıran noktalardır. Bunun yanı sıra dişilerde karın kısmı oldukça şişkin ve tombuldur (Şişman, 2007).

Zebrabalıklarının ortalama yaşam süreleri 2-3 yıl kadardır fakat iyi optimize edilmiş ortamlarda 5 yıl kadar yaşayabilirler. Bu canlılar için ideal sıcaklık 24-28°C, ideal pH aralığı 6.5-7.5'tir (Spence vd., 2008).



Şekil 1.5. Dişi ve Erkek zebrabalıkları (ELLS, 2013)

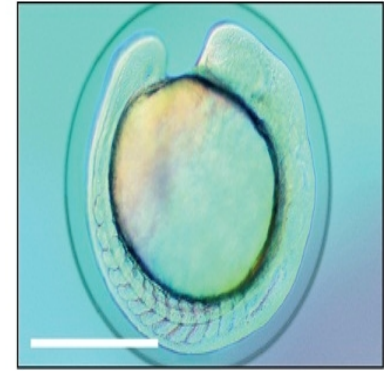
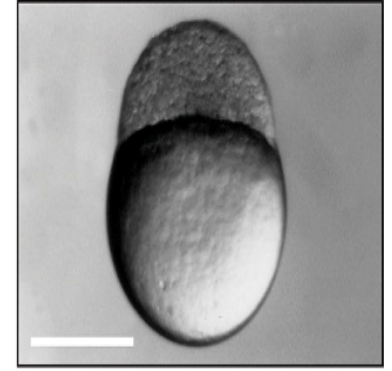
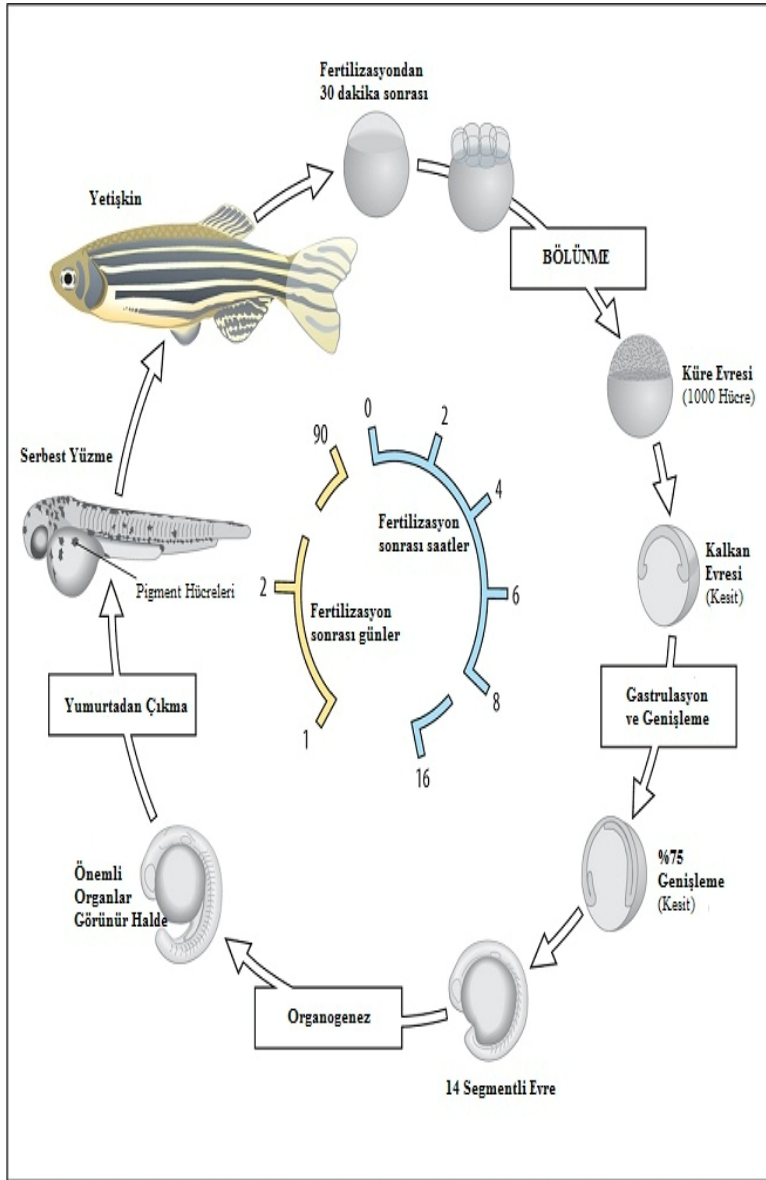
1.3.5. *Danio rerio*'nun Üreme Davranışı

Bu canlıların jenerasyon zamanları yaklaşık 3-4 aydır (Şekil 1.6). Ovulasyon ve yumurtlama için erkek bireylerin de ortamda bulunması gerekmektedir. Dişiler 2-3 gün aralıklarla her seferde yüzlerce yumurta bırakabilir. Döllenmiş yumurtalarda embriyonik gelişim hemen başlar (Spence, 2007). Doğal ortamlarında musonal iklimin yumurtlama periyoduna etkisi büyüktür. Zira yağışın nispeten az olduğu kurak kabul edilebilecek mevsimlerde yumurta üretimi diğer mevsimlere oranla düşmektedir. Bunun yanı sıra besin bolluğu da oluşacak yumurtaların sayısı ve niteliğini etkilemektedir (Lawrence, 2007).

Yumurtalar suyun alt kısmında batık haldedir, suyun sıcaklığı ve kimyasına bağlı olarak embriyolar, 4-7 gün içinde yumurtadan çıkarak suda serbest halde yüzebilecek duruma gelir. Erkek balıklar kendi bölgesel hâkimiyetlerini kurar ve çiftleşme için dişileri kovalamada alternatif stratejiler geliştirirler. Dişilerin çiftleşecek erkeği seçmesinde koku işaretleri de önemlidir (Spence vd., 2006).

Zebrabalıklarının üremesinde koku işaretleri hayati rol oynar. Erkek bireyler, dişilerin ovulasyonu için steroid glukuronitleri suya salar. Ovulasyondan hemen sonra dişiler, yumurtlama ve döllenme için hormonlarını serbest bırakır. Feromonlar, üremeyi baskılama amaçlı da kullanılabilir. Zira baskın dişi kendi topluluğunda bulunan diğer dişileri baskılayarak, üremeye sadece kendisinin katılmasını isteyebilmektedir (Gerlach, 2006).

Her ne kadar yapılan gözlemler yumurtlamada şafak vaktinin önemini vurgulasa da bu canlılar için herhangi bir zaman kısıtlaması yapmak doğru değildir. Araştırmacıların bir kısmı gecenin karanlığı boyunca dişilerden yumurtaların döküldüğünü de gözlemlemişlerdir. Doğal ortamlarda yapılan gözlemler yağışın çok yoğun olduğu zamanlarda yumurtlamanın daha fazla gerçekleştiğini ifade etmişlerdir (Lawrence, 2007).



Şekil 1.6. *Danio rerio*'nun gelişim evreleri (Brian, 2014)

1.3.6. *Danio rerio*'nun Beslenmesi

Zebrabalıkları omnivordur. Doğal yaşam alanlarında tercih ettikleri besin kaynakları arasında zooplanktonlar, böcekler, böcek larvaları, fitoplanktonlar, küçük kabuklular ve kurtçuklar bulunmaktadır (Smith vd., 2007).

Zebrabalıkları, embriyonal, juvenil, yetişkinlik aşamalarında; hayatta kalma, büyüme, gelişme, üreme, hastalıklara ve strese karşı direnç sağlamak için temel besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Bu besin maddeleri proteinler, aminoasitler, lipitler,

karbohidratlar, mineral ve vitaminlerdir. Bunun için doğal yaşam alanlarında en çok tercih ettikleri beslenme şekli canlı yiyeceklerdir. *Artemia* ve bazı rotiferler (*Brachionus* sp.) listenin en başında bulunur (Watanabe vd., 1983).

Doğal besin kaynaklarına alternatif olabilecek ticari besin maddelerinin zebrabalığı embriyoları üzerine etkisi de test edilmiştir. Maya bazlı mikropartiküller protein ya da jelatin kapsüller içine konarak yaşam ortamına bırakılmıştır. *Artemia*'ya ek olarak verilen bu tip ek besin maddelerinin gelişme ve hayatta kalmada çok önemli değişimlere neden olmadığı anlaşılmıştır, *Artemia* oranının daha da azaltıldığı ve yapay besin maddelerinin daha fazla verildiği durumlarda gelişme ve hayatta kalmanın önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Önal vd., 2000).

1.4. Biyolojik Geri Dönüşürlük Testleri

Biyolojik geri dönüşürlükte amaçlanan, herhangi bir pestisite maruz kalan test organizmalarının maruz kalma sonrasında belirlenen süreler içerisinde hayatlarını devam ettirerek, biyobelirteçlerdeki değişimlerin gözlenmesidir. Balık çalışmalarında geri dönüşürlük periyodunda pestisitten uzak temiz su ortamları içerisinde normal besinsel ihtiyaçlar giderilerek balıklar yaşatılmakta ve daha sonra alınan örnekler maruz kalma sürelerinin hemen sonunda alınan örneklerle kıyaslanarak, değişimler incelenmektedir (Sancho vd., 2010, Wang vd., 2013).

1.5. Toksisitenin Değerlendirilmesi Amacıyla Kullandığımız Biyobelirteçler

1.5.1. Biyotransformasyon

Vücuda alınan bir kimyasal organizma iki yolla elemine etme kabiliyetine sahiptir; alınan kimyasalın formu hiç değiştirilmeden olduğu gibi atılır veya organizmanın yapısındaki mekanizmalar vasıtasıyla transformasyona uğratılır. Biyotransformasyondaki temel amaç vücuttan daha kolay atılabilecek ve nispeten daha hidrofilik bir yapıya dönüşümün sağlanmasıdır. Yüksek organizasyonlu hayvanlarda karaciğer yapı ve fonksiyon sebebiyle biyotransformasyon olaylarında en fazla rol alan organdır. Biyotransformasyon gerçekleşirken her zaman organizmaya daha az zararlı bileşiğin ortaya çıkması garanti değildir, zira bazı durumlarda alınan kimyasalın temel özelliklerinden daha zararlı bileşikler de biyotransformasyon sonucu ortaya çıkabilmektedir. Bu olaya biyoaktivasyon denir.

Biyoaktivasyon sonrasında ana bileşikten daha toksik reaktif metabolitler açığa çıkabilmektedir (Klaassen, 2001).

Bu çalışmada kullanılan ksenobiyotiklerin balıklar üzerinde hem toksik etkilerinin saptanması, hem de araştırmanın asıl amacı ile uyumlu olarak 10. ve 20. gün sonunda toksik etkilerin geri dönüşebilirlik potansiyelinin değerlendirilmesi için çeşitli biyobelirteçler kullanılmıştır. Bu biyobelirteçlerin bir kısmı doğrudan birer toksik etki göstergesi iken bir bölümü de organizmada toksik ajanların doğrudan biyotransformasyonundan sorumlu olan biyokimyasal belirteçlerdir.

1.5.1.1. Glutasyon S-transferaz

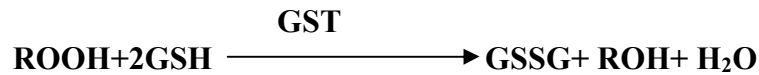
Faz II biyotransformasyon enzimlerinin en önemlisi Glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18)'dir. GST, elektrofilik bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizler. Bu enzim, çok çeşitli ksenobiyotikleri daha hidrofilik hale getirip, taşınma ve atılması için elektrofilik bileşikler veya grupları tripeptit redükte glutasyon [GSH; N-(N-L-glutamil-L-sisteinil) glisin] ile konjugasyonunu katalizler (Schmidt vd., 2005 ve Monteiro vd., 2007).

Çoğu ksenobiyotiğin toksisitesi GST indüksiyonu ile tespit edilebilmektedir. GST, sadece lökotrienlerin ve prostoglandinlerin sentezi ve taşınmasında rol oynamaz, aynı zamanda DNA'nın ve lipidlerin peroksidatif ürünlerine karşı savunmasında ve oksidatif hasara karşı da önemli rolleri olduğu bilinmektedir (Van der Oost vd., 2003).

GST, hücrede çoğu zaman sitozoliktir, fakat membran bağlı ve mitokondriyal izoformları da bilinmektedir. Dokular arasında GST varlığı farklılık gösterebilmektedir. GST aktivitesinin belirlenmesi için sucul canlılarda karaciğer incelenebildiği gibi solungaç, bağırsak ve böbrek gibi organlarda biyobelirteç amaçlı kullanılabilir. Yapılan araştırmalarda, GST aktivitesinin özellikle karaciğerde diğer organ ve yapılara göre daha fazla indüklenebildiği ifade edilmiştir (Ahmad vd., 2000).

Bir maddenin GST substratı olabilmesi için temel 3 özelliğe sahip olması gerekir; GSH ile enzimatik olmayan reaksiyona girebilmeli, hidrofobik olmalı ve elektrofilik atom içermelidir. Balık türlerinde GST aktivitesini ölçebilmek amacıyla substrat olarak doğal olmayan 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'in konjugasyon reaksiyonu kullanılabilir (Van der Oost vd., 2003).

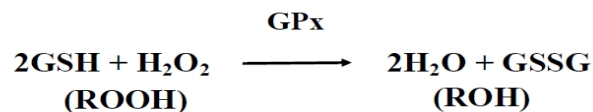
GST'nin iki farklı işlevsel bölgesi vardır; G bölgesi GSH'ı bağlayan bölgedir ve hemen hemen tüm GST'lerde aynıdır. H bölgesi ise GST'ler içinde tamamıyla farklıdır ve substrat bağlama kapasitesi değişkendir. H bölgesinin varlığı nedeniyle GST substrat çeşitliliği gösterir ve karsinogenik bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçlar gibi çok çeşitli spektrumdaki kimyasal maddeler üzerinde etkilidirler (Armstrong, 1997).



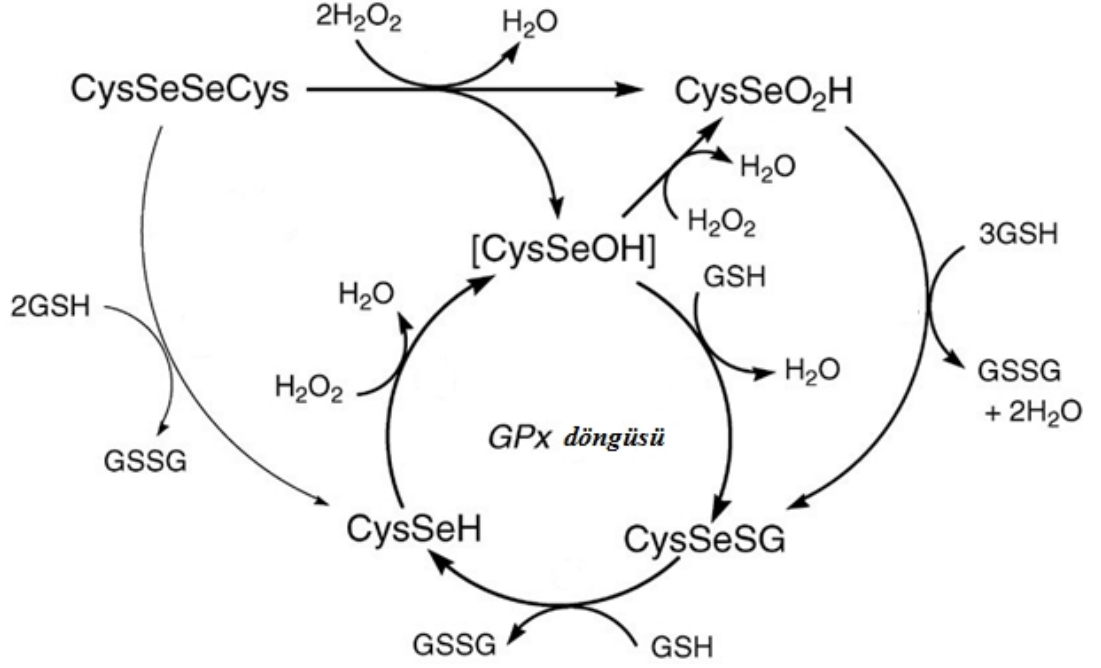
GST ile ilişkili olarak, GST proteinleri 2 süper gen ailesi içerir. Sitozolik enzim 16 gen ailesi ile mikrozomal enzim en az 6 gen ailesi ile temsil edilmektedir. Bu iki GST ailesinin oksidatif strese ve toksik kimyasallara karşı hücresel korunmada önemli bir rolü olduğuna inanılmaktadır (Hayes vd., 2000, Strange vd.,2000).

1.5.1.2. Glutatyon Peroksidaz

Glutasyon peroksidaz, (GPx, EC1.11.1.9) büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerin ve hidrojen peroksidin redüklenmesini sağlayan bir enzimdir. Sitozolde lokalize olmuştur ve dört selenyum atomu içeren tetramerik bir yapıya sahiptir. En yüksek aktiviteyi karaciğerde gösterirken, kaslardaki aktivitesi düşüktür. Orta düzey aktiviteyi ise kalp, akciğer ve beyinde gösterir. GPx'in temel görevi glutasyonun (GSH), okside glutatyon (GSSG) oksidasyonunu katalizlemesidir. Bu katalizasyon işlemi için aşırı hidrojen peroksit varlığına ihtiyaç duyulur ve hidrojen peroksidi suya indirgeyerek detoksifikasyon işlemini gerçekleştirmiş olur (GATA, 2014) .



GPx enzimi iki substratla çalışır. Peroksit gibi substratlar alkole kadar indirgenirken, glutatyon (GSH) ise okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir (Şekil 1.7). GSSG, GR (glutatyon redüktaz) enzimi vasıtasıyla tekrar redükte glutatyona dönüşür (Prieto-Alamo vd., 1993). GSH varlığı enzimin aktivitesini doğrudan ilgilendirmektedir, zira hidrojen kaynağı GSH'tır. Bunun yanında aktiviteyi etkileyen bir diğer önemli etken selenyumdur. Selenyum eksikliği neticesinde GPx aktivitesinde azalma olur ve lipid peroksidasyonunda artışlar meydana gelir (Terada, 2005).

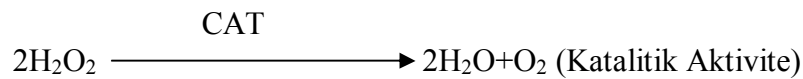


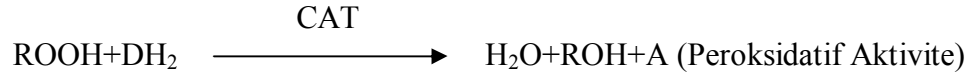
Şekil 1.7.GPx katalitik döngüsü (Beena, 2010)

1.5.1.3. Katalaz

Katalaz, (CAT, EC 1.11.1.6) yapısında dört ‘hem’ grubu içeren bir hemoprotein olup, peroksisomlarda bulunmaktadır. En yüksek aktiviteyi hepatositlerde ve eritrositlerde göstermektedir. Anaerobik hücrelerde katalaz bulunmazken, aerobik mikroorganizmalarda, bitkilerde ve memeli hücrelerinde bulunmaktadır. Katalazın esas görevi hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene kadar parçalamaktır (Prieto-Alamo vd., 1993).

CAT enziminin iki yönlü aktivitesi vardır, bunlar; katalitik aktivite ve peroksidatif aktivitedir. Katalitik aktivite esnasında, H_2O_2 molekülü parçalanır. Bu esnada molekülün biri hidrojen vericisi olarak davranırken, diğeri oksidant olarak davranmaktadır. Peroksidatif aktivitede ise redüktant (DH_2) hidrojen vericisidir. DH_2 ’den kasıt, aminler, fenoller, formik asit, etanol ve metanol gibi maddelerdir. Her iki reaksiyonda da enzim- H_2O_2 ara bileşiği oluşur ki bu kompleks I olarak adlandırılır. CAT’ın katalitik aktivitesi çok hızlı gerçekleşirken peroksidatif aktivite nispeten daha yavaştır (Kelly vd., 1995).



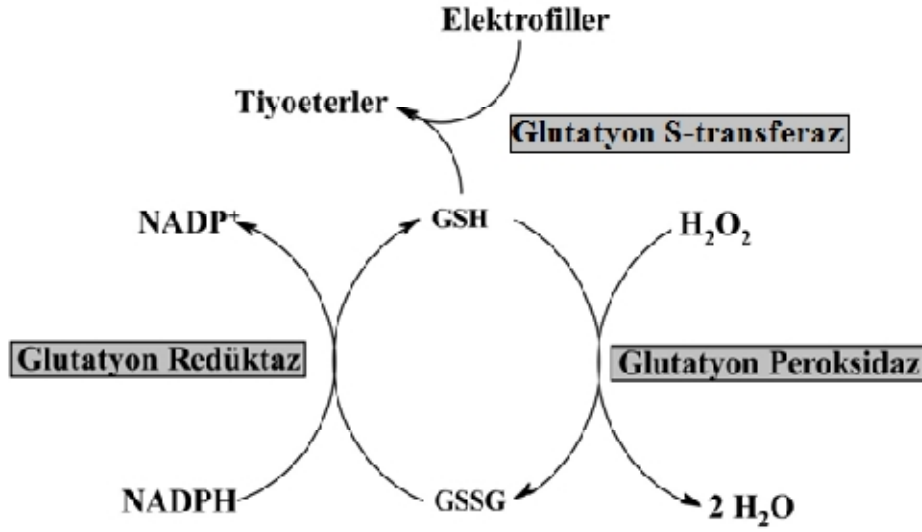


1.5.1.4. Glutasyon Redüktaz

Oksidatif stres koşulları altında GSH/GSSG dengesini sağlamadaki rolü nedeniyle Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.6.4.2) önem arz eden bir enzimdir. NADPH varlığında okside disülfid glutasyon formunun (GSSG), redükte forma (GSH) dönüşümünü katalizler (Van der Oost, 2003). Antioksidan savunma sisteminde, süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) enzimleri gibi direkt olarak yer almayan GR'nin aktivitesinin tespit edilmesinde oksidatif stresin iyi bir belirteci olabileceği düşünülmektedir (Machala vd., 1998, Peixoto vd., 2006).

GSH, bir tripeptittir ve oksidan moleküllerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrelerde var olan fonksiyonel proteinlerin okside olmasını engellemektedir (Şekil 1.8). GSH bazı durumlarda kofaktör olarak da kullanılabilir, zira oksijen radikallerinin büyük moleküllere saldırması sonucunda ortaya çıkan peroksitleri bertaraf etme amacıyla bazı peroksidaz enzimleri görev almaktadır. Bu enzimlerin çalışabilmesi için GSH gerekmektedir. Tüm bu olayların neticesinde, kendisi oksitlenerek okside glutatyon dönüşmekte ve açığa çıkan bu okside glutatyonun tekrar redükte glutatyon haline gelebilmesi için de GR görev almaktadır. GR, GSH'nin hücre içindeki düzeyi azalınca aktif hale gelir ve zaten organizmada sınırlı olan GSH deposunu tekrar tamamlar (Forney vd., 1982 ve Yan vd., 1997).

Reaktif oksijen bileşiklerinin detoksifikasyonunda GSH iki şekilde rol alır; (1) GSH süperoksit radikal anyonu, nitrik oksit veya hidroksil radikali gibi serbest radikallerle reaksiyona girer, (2) GSH, GPx (glutasyon peroksidaz) tarafından gerçekleştirilen peroksitlerin redüksiyonuna elektron alıcısı olarak katılır. Bu nedenle GSH miktarında ve GSH/GSSG oranında azalma ve GSSG düzeyinde artış oksidatif stresin belirteci olarak kabul edilir (Camera vd., 2002).



Şekil 1.8. GR'nin GSH metabolizmasındaki yeri

1.5.2. Esterazlar

En basit şekliyle esterazlar üç gruba ayrılmaktadırlar; A esterazlar, genellikle memelilerde bulunurlar ve paraokson veya diğer nötral organofosfat tiyoesterleri hidrolizlerler. İsimlendirilmeleri substrata göre (paraoksonaz) veya kimyasal yapılarına göre (fosfotriesteraz) dir. B esterazlar, hidrolazların büyük grubudur. Organofosfatlı bileşikler tarafından inhibe edilirler. Asetilkolinesteraz (AChE), butirilkolinesteraz (BChE) ve karboksilesteraz (CaE) bu grupta yer alırlar. C esterazlar ise organofosforlu bileşikler ile etkileşime girmezler (Aldridge, 1953).

1.5.2.1. Karboksilesteraz

Karboksilesteraz (CaE, EC 3.1.1.1) esterlerin, amidlerin, tioesterlerin hidrolizini katalizleyen esterazların serin hidrolazlar süper ailesinin üyesidir (Ross, 2006). Pestisitler için alternatif fosforilizasyon alanları olduklarından dolayı CaE'lerin veya B-esterazların inhibisyonu, kolinesterazlardan daha hızlıdır. Karboksilesterazın bir organofosfat toksisite tampon enzimi olduğu düşünüldüğünde, kolinesterazlar rekabet açısından CaE tarafından korunmuş olabilirler. Bu nedenle CaE, pestisit uygulamasına karşı kolinesterazlardan daha duyarlı bir biyobelirteç olarak kullanılabilir (Küster, 2005).

CaE'ler, çoğu memeli dokusunun mikrozomal fraksiyonlarında bulunabilen 47 ve 65 kDa arasında moleküler ağırlıklı proteinlerdir. CaE omurgalı ve omurgasızların birçok dokusunda mevcuttur ve genellikle karaciğerde yüksek düzeyde bulunur. CaE omurgalılarda karaciğerde sentezlenir ve plazmaya salgılanır, orada çözünür formda bulunur. Ayrıca akciğer, merkezi sinir sistemi, testis, yağ doku, kalp, kas ve lökositlerde de farklı düzeylerde CaE bulunabilir. Aktif bölgesinde serin bulunan CaE, iki-fazlı bir reaksiyonla karboksilik asidin esterlerini hidrolizler. İlk aşamada karboksilik ester, aktif bölgedeki serinin hidroksil grubunu açiller ve ikinci aşamada serin, suyun varlığında deaçillenir. CaE'nin aktif bölgesi izolösin-fenilalanin-glisin-histidin-serin-methioninglisin-glisin'den oluşan bir peptid içermektedir. AChE ve BChE, asetilkolin ve butirilkolin gibi pozitif yüklü esterler ile reaksiyona girerler ve karbamatlar tarafından inhibe edilirler. Oysaki CaE pozitif yüklü esterler ile reaksiyona girmez ve karbamatlar ile inhibisyon sadece yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkar (Huang vd., 1997 ve Jkanoviç vd., 2001).

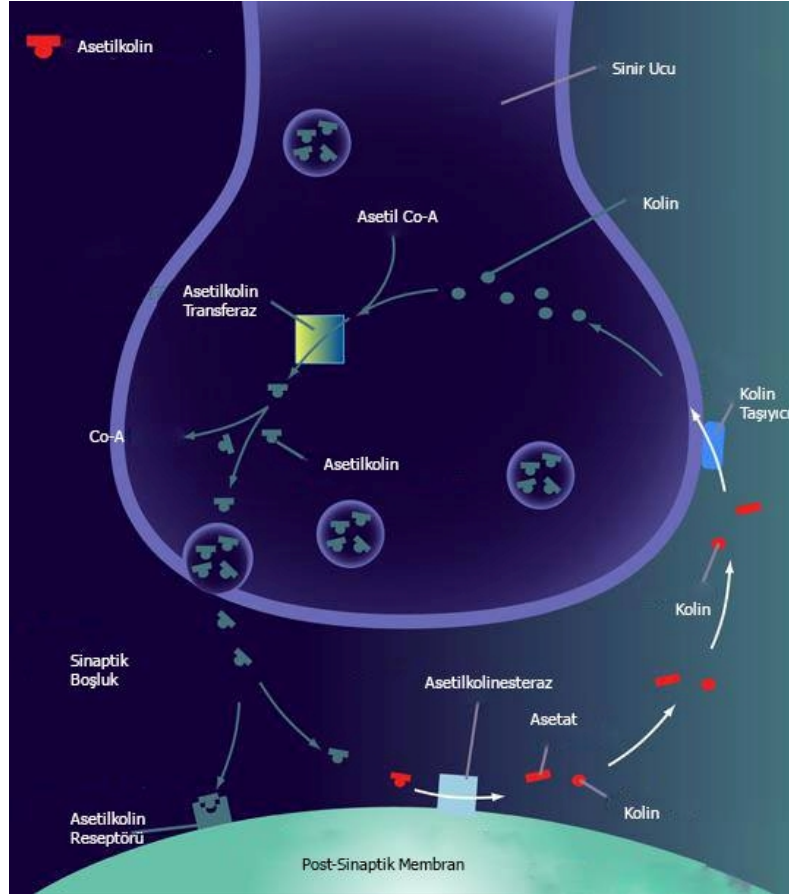
Organizmadaki ksenobiyotiklere karşı duyarlılık neticesinde CaE aktivitesi etkilenebilmektedir. Dolayısıyla, CaE aktivitesini belirlemek, herhangi bir ekosistem üzerinde tarımsal kimyasalların etkilerini de açığa çıkarmak için iyi bir yol olabilir (Wheelock vd., 2005).

CaE'lerin üç farklı yoldan OP bileşiklerin detoksifikasyonuna katıldığı düşünülmektedir. Birinci yol, malatyon gibi ester bağları içeren OP'den bu bağlar CaE tarafında hidrolizidir. İkinci yol, OP'nin CaE ve diğer proteinlere bağlanmasıdır ki, bu durumda sirkülasyondaki serbest OP'nin konsantrasyonu azalır, böylece hayati dokularda AChE ile reaksiyona girebilme ihtimali azalabilir (balıklarda OP'lerin karaciğer CaE'yi fosforilleme affinitesi AChE'den daha yüksektir). Üçüncü yol, bütün OPlar, CaE'lerin aktif bölgesindeki serinin hidroksil grubuna bağlanarak enzimleri fosforilleyebilirler. Bu fosforil grubu sudan bir hidroksil grubu alarak kendiliğinden enzimden ayrılmakta ve oluşan OP bileşik (ör. organofosforik asit) ana bileşikten daha az toksik hale gelmektedir (Jkanoviç vd., 2001, Küster, 2005).

1.5.2.2. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7), genellikle sinir dokusunda bulunur ve özellikle beyinde lokalize olmuştur. ACh (asetilkolin)'i kolin ve asetik asite indirgeyen bu enzim özgül bir esterazdır. Balıklarda ve omurgalılarda ACh, özellikle

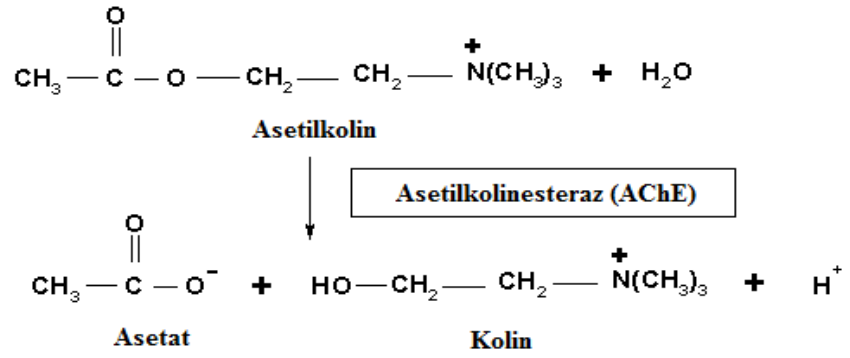
nöromüsküler sinapslarda, otonom sinir sisteminde ve beyinde primer nörotransmitterdir. Sinir impluslarının iletimi sırasında ACh, nikotinik reseptörler veya muskarinik reseptörler gibi bir ya da iki genel reseptöre bağlanır. Nöromüsküler sinapslarda ACh'nin nikotinik reseptöre bağlanması uyarma ve kas kasılması ile sonuçlanır. AChE postsinaptik membrana bağlanarak ACh'nin bağlantısını keser ve böylece kolinerjik nöral transmisyon sona erer (Şekil 1.9) (Beauvais vd., 2000).



Şekil 1.9. AChE'nin impuls iletimini sonlandırma basamakları (Katzung, 2001)

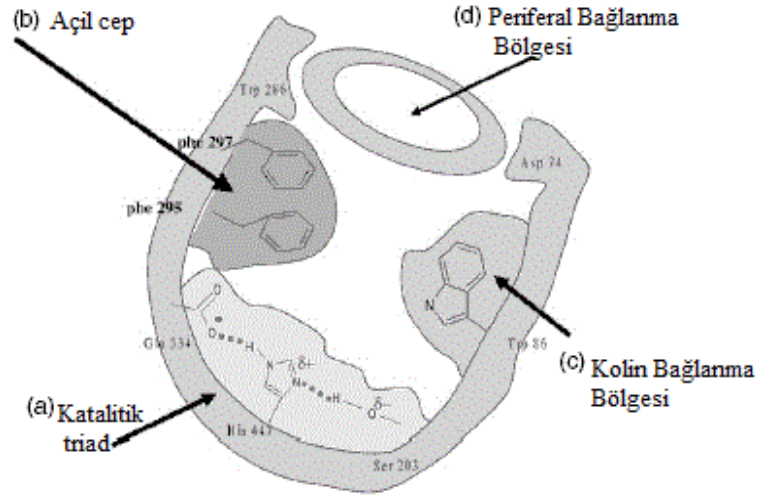
Asetilkolinin kolin ve asetik asite hidrolizi sonucu reseptörlerin sürekli olarak uyarılması engellenmiş olur. AChE-asetilkolin bağlanması, esteratik alt merkez adı verilen aktif merkezin ikinci bölgesinde birtakım hidrolitik tepkimeler meydana getirir. Asetilkolinin ester bağının kırılmasıyla asetat ve kolin açığa çıkar (Şekil 1.10). Kolin daha sonra tekrar kullanılmak üzere yüksek affiniteli kolin toplama sistemi aracılığıyla hemen tutulur. Bu sistem presinaptik membranda bulunmaktadır. Asetat ise serin ile kovalent bağ yaparak AChE'nin geçici formu denebilecek

asetilenmiş formunu meydana getirir. Bu form bir molekül suyla reaksiyona girerek asetat grubu serbest hale geçer. AChE iki aktif kısma sahiptir (Şekil 1.11). Bunlar; esterik ve anyonik kısımlardır. Anyonik kısım adından da anlaşılacağı gibi negatif yüklüdür ve iki karboksilli bir aminoasidin iyonize karboksil grubundan ibarettir. ACh'nin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esterik kısım ise pozitif yüklüdür ve kendi içinde iki kısmı bulunmaktadır. Birincisi serin hidroksil grubudur ve ikincisi histidinin bazik imidazol halkasıdır. Bu kısım serinin hidrojen bağları ile bağlanarak etkinliği artırır (Vale, 1998, Ören, 2009).



Şekil 1.10. Asetilkolinin parçalanması (Chemie, 2014)

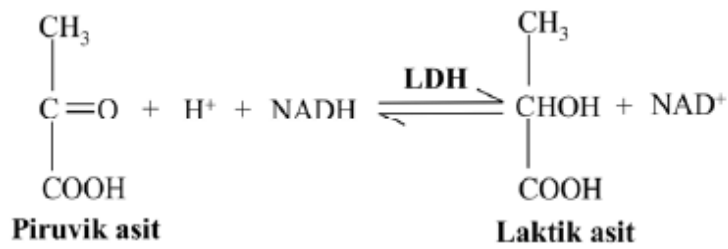
Organofosfatlara maruz kalındıktan sonra AChE inhibisyonu gerçekleşmektedir. Bu inhibisyonun geri dönüşü genellikle balıklarda haftalarca süren uzun bir süreçten sonra enzimin yeniden *de novo* sentezine bağlıdır (Wogram vd., 2001). Enzim inhibisyonu neticesinde sinir sisteminde asetilkolin hızla birikmeye başlar. Bu birikim sürekli impuls iletimi anlamına gelir. Sürekli uyarılma halinin doğal neticesi olarak kaslarda tetani, solunum kaslarında bozukluklar daha ileri aşamalarda felç tablosu ve en sonunda ölüm gerçekleşir (Pretti vd., 2001).



Şekil 1.11. AChE'nin yapısı (Mohammed, 2003)

1.5.3. Laktat dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH, EC 1.1.1.28), glikoliz olayında pirüvik asidin laktik aside dönüşümünü sağlayan sitozolik bir enzimdir. LDH, normal hücresel işlevler açısından çok önemlidir zira, glikolizin düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır. Glikoliz sürecinde açığa çıkan NADH ve pirüvik asit oksidasyonu yeterli oksijenle desteklenmelidir aksi takdirde LDH'n aktivitesi ile pirüvik asidin laktik aside redüksiyonu sonucu NAD^+ üretimi gerçekleşir (Şekil 1.12) (Bernet vd., 2001, Nelson vd., 2004).



Şekil 1.12. Laktat dehidrogenazın katalizlediği reaksiyon

LDH aktivitesi doku hasarı olduğu zaman (hasar sebebi hastalık veya ksenobiyotiğe maruz kalma olabilir) önemli düzeyde etkilenebilmektedir. Zira normal şartlarda LDH tüm dokularda bulunmaktadır. Hücresel hasarın boyutu bu enzimin aktivitesindeki değişimin derecesinde önemli rol oynamaktadır (Singh vd.,

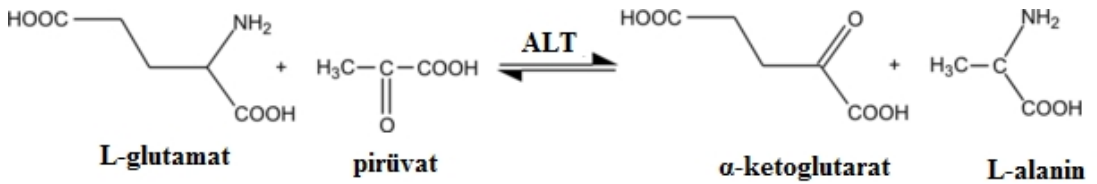
1998). LDH enziminin karaciğer, böbrek ve kas dokularındaki aktivitesi plazmadakinden yüksektir. Plazmada yüksek LDH aktivitesi tespiti adı geçen doku ve organlardaki harabiyet konusunda fikir sahibi olunmasını sağlar (Bernet vd., 2001).

Omurgalılarda, beş farklı LDH izozimi bulunmaktadır. Bu izozimler M ve H polipeptitlerinin farklı oranlarda olması şartıyla dört polipeptit zincirinden oluşurlar. Memeli iskelet kasına ait LDH izozimi dört M polipeptidinden, kalp kası izozimi dört H polipeptidinden oluşur. Balıklarda ise Tip C izozimi karaciğerde bulunmaktadır (Asztalos vd., 1990 ve Nelson vd., 2004).

1.5.3.1. Aminotransferazlar

1.5.3.1.1. Alanin Aminotransferaz

Alanin aminotransferaz (ALT, EC 2.6.1.2), alanin aminoasidinin amino grubunu α -ketoglutarata transfer ederek pirüvat ve glutamik asit sentez reaksiyonunu katalizler. Glukoz ve protein metabolizmasında önemli işlevleri olan bir enzimdir. Böylece vücut için toksik özelliği olan amonyağın üreye çevriminde görev alır. ALT hepatosit ve sitoplazmada lokalize olmuştur. Karaciğerde konsantrasyonu en yüksek seviyededir dolayısıyla serumda yüksek ALT düzeyinin tespiti karaciğer hasarı konusunda fikir sahibi olunmasını sağlar (Güneş, 2010).

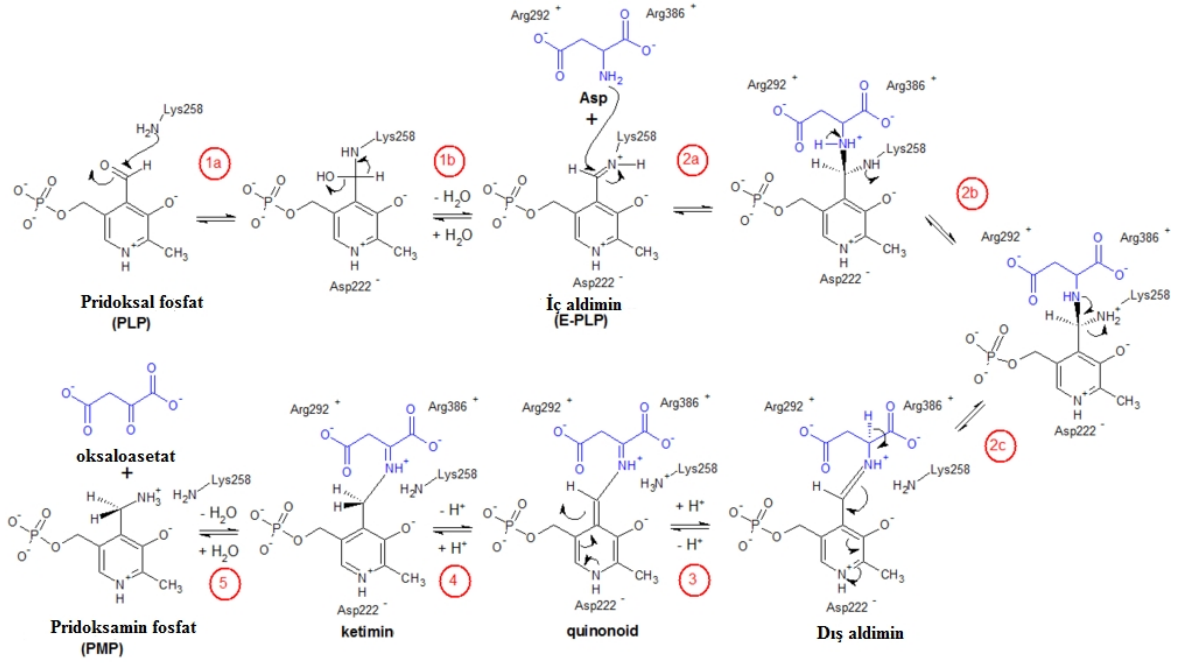


1.5.3.1.2. Aspartat Aminotransferaz

Glutamat oksaloasetat transaminaz (GOT) olarak da adlandırılan aspartat aminotransferaz (AST, EC 2.6.1.1) L-aspartat ile 2-oksaloasetat arasında geri dönüşümlü transaminaz reaksiyonunu katalizleyen enzimdir (Vaglio vd., 1999).

AST, çözünür sitozolik form (c-AST) ve mitokondriyal form (m-AST) olmak üzere iki forma sahiptir. Her iki form da üre ve sitrik asit döngüsü arasında bir bağlantı olarak katılmaktadır. Glikoneogenesis sürecinde c-AST daha aktif rol oynamaktadır (Srivastava vd., 1990).

AST, diğer tüm transaminazlar gibi çift tabakalı tanımlama ile çalışır (Şekil 1.13). yani iki amino asidin (Asp ve Glu) farklı yan zincirini tanır ve selektif olarak bağlanır (Hirotzu, 2005). İlk yarı reaksiyonda, aminoasit (L-Asp gibi) enzim-PLP (pridoksal fosfat) kompleksiyle reaksiyona girer ve oksaloasetatı üretir ve enzim-PMP (pridoksamin fosfat) kompleksini modifiye eder. İkinci yarı reaksiyonda α -ketoglutarat, enzim-PMP kompleksi ile reaksiyona girer ve L-Glutamat aminoasidini oluşturur. Bu süreç içinde enzim-PLP kompleksi rejenere olur ve D-Glutamat gibi rasemik ürün formasyonları nadirdir (Kochhar vd., 1992).



Şekil 1.13.AST reaksiyon metabolizması (Kirsch, 1984)

2.KAYNAK ÖZETİ

Sipermetrin ve fosalon pestisitlerinin sucul canlılarda toksik etkileri ile bağlantılı olarak çeşitli enzim aktivitelerinin değerlendirildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca literatürde hem kullanılan pestisitlerin kombine etkilerinin hem de etkinin geri dönüşürlüğünün değerlendirildiği bir çalışmaya ise rastlanmamıştır. Deney hayvanı olarak kullandığımız *D. rerio* üzerine bu pestisitlerin etkilerinin daha önce çalışılmamış olması, literatür taramalarında çalışmaların büyük ağırlığının embriyonik gelişim ve benzeri fizyolojik etkileri üzerine olması da bu araştırmanın orijinalliğini göstermektedir.

Piretroit grubu pestisitlerle ve/veya *D. rerio* ile yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde;

Permetrin ve sipermetrinin subletal konsantrasyonlarının zebrabalığı embriyolarına olan etkisinin incelendiği bir araştırmada, sipermetrin konsantrasyonu arttıkça embriyoda gelişimsel anomaliler saptanmıştır. İki pestisit ayrı ayrı uygulandığında SOD enzimi üzerinde istatistiksel olarak fark gözlenmemiş, fakat karışım hallerinde SOD enziminin önemli ölçüde indüklendiği bildirilmiştir. Aynı durumun CAT enzimi için de geçerli olduğu ifade edilmiştir (Yang vd., 2014).

Sipermetrinin, yetişkin zebrabalıkları üzerinde hepatik oksidatif strese, DNA hasarına ve apoptoza olan etkisi araştırılmış, sipermetrinin oksidatif stresi, DNA hasarını ve apoptoza bağlı gen ifadesini arttırdığı ifade edilmiştir. Bu parametrelere bağlı olarak balıklar üzerinde sipermetrinin etkilerini ve toksisitenin mekanizmalarını anlamaya yardımcı olabileceği ifade edilmiştir (Yuanxiang vd., 2011).

Bir başka çalışmada zebrabalıklarının embriyo gelişimine sipermetrinin etkileri incelenmiş, 96 saat boyunca pestisite maruz kaldıktan sonra morfolojik anomaliler açıklanmıştır. Ayrıca sipermetrinin malondialdehit (MDA) üretimini arttırdığı ifade edilmiştir. Değişik konsantrasyonlarda pestisite maruz kalınmasına rağmen özellikle oksidatif stres belirteci olan SOD ve CAT enzimlerinin de indüklendiği vurgulanmıştır (Xiangguo vd., 2011).

Piretroit grubuna ait fenvalarata maruz kaldıktan sonra zebrabalıklarının beyin gelişimleri ve çeşitli enzim aktiviteleri Aihua vd. (2010) tarafından incelenmiştir. 24, 48, 72 ve 96 saatlik LC₅₀ düzeyleri tespit edilmiş ve SOD enzimi aktivitesi

ölçülmüştür. Maruz kaldıktan sonra SOD aktivitesinde artış tespit edilmiş ve çalışma sonunda bu pestisit nörötoksisiteyi arttırdığı vurgulanmıştır.

Suveta vd. (2010), sipermetrine maruz bırakılmış *Cyprinus carpio* balıklarında 24 saatlik LC₅₀ değerini tespit ettikten sonra sodyum, potasyum, klor düzeylerini incelemiş ve Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesini ölçmüşlerdir. Buna göre uygulama sonrasında balıklarda sodyum, potasyum, klor düzeylerinde belirgin düşüşler tespit edilmiş ve Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinde inhibisyon olduğu belirlenmiştir. Subletal konsantrasyonlarda doz uygulamalarında plazma ve solungaçta adı geçen parametrelerdeki değişiklikleri açıklamışlardır. Sipermetrine bu canlıların oldukça hassas olduğunu ve parametrelerinin kolaylıkla değişebileceğini vurgulamışlardır.

Su kalitesinin izlenmesi ve değerlendirilmesi için yapılan bir çalışmada *Daphnia magna* ve *D. rerio*'nun, gösterdikleri toksik yanıtlar incelenmiş ve kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama neticesine göre akut toksisite testlerinde *D. magna*'nın, *D. rerio*'ya göre daha yüksek hassasiyet gösterdiği ifade edilmiştir. Memelilerin, kabuklu canlıların ve balıkların farklı maruz kalınma yollarına, hedef organlara ve toksik mekanizmalara sahip olmalarına rağmen, akut toksisite deneylerinde balıkların ve *D. magna*'nın daha kullanışlı olduğu sonucuna varılmış ve memelilerden önce test organizması olarak bu canlıların kullanılması gerektiği de vurgulanmıştır (Martins vd., 2007).

Sipermetrin uygulaması sonrasında *Heteropneustes fossilis*'te plazma kalsiyum miktarlarının değişimine dair yapılan bir çalışmada, sipermetrine uzun ve kısa süreli maruz bırakılan deney grupları oluşturulmuştur. Buna göre; 48, 72, 96 saatlik kısa süreli maruz kalınmada plazma kalsiyum düzeyleri önemli ölçüde azalmıştır. 7 ve 28 günlük uzun süreli maruz kalma sonrasında kalsiyum seviyeleri düşmeye devam etmiştir. 28 günlük uzun süreli uygulama sonucunda hücresel hacimde önemli miktarda azalma ve dejenerasyonlarda artış olduğu vurgulanmıştır (Diwakar vd., 2005).

Piretroit grubuna dâhil olan deltametrinin lepistes balıklarına (*Poecilia reticulata*) etkilerinin saptanması amacıyla 210 balık üzerinde 3 tekrarlı yapılan çalışmalar neticesinde 48 saatlik LC₅₀ değerleri tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, pestisit uygulaması sonrasında deney hayvanlarındaki davranışsal değişimler de gözlenmiştir. Çok yüksek dozlarda hızlı solungaç hareketi, düzensiz yüzme şekli ve ilerleyen zamanlarda hareketsiz kalma gibi davranışların gözlemlendiği vurgulanmıştır (Viran vd., 2003).

Deltametrine maruz kalan *C. carpio*'da GST aktivitesinde artış olduğu, MDA seviyesinin ve CAT aktivitesinin yükseldiği tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada en önemli değişimin GR aktivitesinde olduğu vurgulanmış, pestisit uygulamasından sonra GR aktivitesinin önemli düzeyde arttığı ifade edilmiştir (Ensibi vd., 2013).

Bir başka araştırmada ise *C. carpio* embriyoları laboratuvar ortamında deltametrine maruz bırakılmış ve bu pestisit etkileri tespit edilmeye çalışılmıştır. Deltametrinin en düşük konsantrasyonunda embriyo ölümleri az miktarda iken, konsantrasyon arttıkça embriyo ölümlerinde belirgin miktarlarda artış olduğu ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında deltametrine maruz kalan balıkların gelişim ve üremede olumsuz etkiler oluşturduğu, bu kimyasalın kullanıldığı tarım arazilerine yakın su kaynaklarındaki canlılığı tehdit edebileceği vurgulanmıştır (Köprücü vd., 2004).

Piretroit grubu pestisitlerin sucul canlılara erken gelişim evrelerinde verdiği zararı tespit etmek amacıyla *Xenopus laevis* iribaşlarıyla yapılan bir çalışmada, iribaşlar deltametrin ve λ siyalotrine maruz bırakılmış ve çeşitli enzim aktiviteleri incelenmiştir. GST, CaE, LDH enzim aktivitelerinde λ siyalotrine maruz kaldıktan sonra inhibisyon tespit edilmiş, her iki pestisit de asit fosfataz ve AST enzim aktivitelerinde inhibisyona neden olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca deltametrinin AChE aktivitesinde baskılanma oluşturduğu açıklanmıştır. Piretroitlere karşı bu canlının iribaşlarının hassas olduğu vurgulanmıştır (Aydın-Sinan vd., 2012).

Miao vd. (2013), organoklorlu bir pestisit olan endosülfanın zebrabalıklarına olan etkisini araştırmışlardır. Buna göre, 7, 14, 21, 28 günlük değişik konsantrasyonlardaki doz uygulamaları sonucunda sitokrom P450 bağımlı enzimler olan NADPH-P450 redüktaz (NCR), aminopiren N-demetilaz (APND), eritromisin N-demetilaz (ERND) ve GST aktiviteleri tespit edilmiştir. GST aktivitesinin uygulanan tüm konsantrasyonlarda yüksek olduğu vurgulanmış, eşeye bağlı yapılan sınıflandırmada, NCR aktivitesinin erkeklerde dişilere oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiş, benzer farklılıkların 28. günde APND ve ERND'de de olduğu ifade edilmiş ve 7. günde GST aktivitesinin de en yüksek düzeyde olduğu belirtilmiştir.

Bir fungusit olan trisiklazolün zebrabalıkları üzerindeki fizyolojik etkileri ve geri dönüşürlüğünün incelendiği bir çalışmada, 96 saatlik LC₅₀ değeri tespit edilmiş ve sonrasında 7 ve 14 günlük geri dönüşürlük için pestisit uygulamasına son verilmiştir. Tüm vücutta trigliserit, kolesterol, glukoz, laktat ve total protein miktarı tespitinin yanı sıra, AST, ALT, alkalen fosfataz (AP), LDH enzim aktiviteleri ve γ -

glutamil transpeptidaz (γ GT) ve vitellogenin miktarı da ölçülmüştür. Fungusit uygulamasından sonra trigliserit, kolesterol, glukoz ve laktat miktarlarında artış, LDH, ALT, AST ve AP aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Fungusite maruz kalmanın total protein miktarına etki etmediği vurgulanmıştır. Geri dönüşüm süresi sonunda kolesterol ve glukoz seviyeleri normal düzeye erişmiş, trigliserit ve laktat yükselmeye devam etmiş, deney sonrasında herhangi bir enzim düzeyinde geri dönüşüm sağlanamamıştır (Encarna vd., 2009).

Sipermetrinin *Clarias batrachus* üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, maruz kalma sonrasında karaciğer ve solungaç örneklerinde total protein, amino asit, amonyak, glikojen miktarlarının yanı sıra AST, ALT, glutamat dehidrogenaz ve glikojen fosforilaz enzim aktiviteleri de ölçülmüş ve bu pestisit canlı üzerindeki LC₅₀ düzeyi de saptanmıştır. Tüm bu uygulamalardan sonra 10 günlük geri dönüşüm için balıklar temiz ve içinde kimyasal madde olmayan suda yaşatılmıştır. Ölçülen parametreler uygulama sonrasında ve geri dönüşürlük periyodu sonunda karşılaştırılmış ve ortaya çıkan farklar açıklanmıştır. Buna göre, glikojen seviyesi geri dönüşüm süresi sonunda normal düzeylere ulaşmışken, enzim aktivitelerinde bu süre sonunda artış devam etmiştir (Ghousia, 2005).

Batı İspanya’da yaygın kullanıma sahip fungusitlerden tebukonazol’un *D. rerio* üzerindeki fizyolojik etkilerinin değerlendirildiği bir araştırmada fungusit içermeyen su ortamlarında geri dönüşürlük etkisi de saptanmıştır. Pestisit 24 ve 96 saatlik LC₅₀ değerleri saptandıktan sonra 7 ve 14 gün süreyle pestisite maruz bırakılmış olan balıklarda hemen sonrasında 7-14 gün boyunca geri dönüşüm izlenmiştir. Tüm vücut homojenizasyonundan sonra vitellogenin, trigliserit, kolesterol, glukoz, laktat ve protein miktarları tespit edilmiş, bunun yanı sıra ALT, alkalen fosfataz (AP), LDH ve γ -glutamil transpeptidaz (γ GT) enzim aktiviteleri incelenmiştir. Tüm bu veriler sonucunda geri dönüşürlük için daha fazla zamana ihtiyaç duyulabileceği vurgulanmıştır (Sancho vd., 2010).

Deltametrin ve karbofuran pestisitlerine *Tinca tinca* balıkları 60 gün boyunca maruz bırakılmış ve devamında 30 günlük geri dönüşürlük periyodu uygulanmıştır. Deneyde AChE aktivitesi ile malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) seviyeleri tespit edilmiştir. Karbofuran uygulaması sonunda AChE aktivitesi önemli ölçüde azalmış olup 30 günlük geri dönüşüm periyodundan sonra bazal seviyeye tekrar ulaştığı ifade edilmektedir. Deltametrine maruz kalma sonrasında AChE aktivitesinin önemli ölçüde etkilenmediği bildirilmiştir MDA ve GSH seviyelerinin

de uygulanan pestisite ve uygulama süresine bağılı olarak değişim gösterdiği vurgulanmıştır (Hernandez-Moreno vd., 2010).

Organofosforlu pestisitlerle ve /veya *D. rerio* ile yapılan çalışmalar;

Lepistes balıklarının (*Poecilia reticulata*), paratyon ve klorpirifos pestisitlerine maruz bırakıldığı bir çalışmada, 96 saatlik LC₅₀ değerleri tespit edilmiş, ayrıca subletal konsantrasyonlarda madde uygulamasına devam edilmiştir. Beyin, karaciğer ve solungaç gibi organlar kullanılarak antioksidan savunma sisteminin durumu ortaya konmuştur. CAT, GST, GR ve SOD enzim aktivitelerinin uygulanan doza bağılı olarak değişimler gösterdiği ifade edilmiş, bu pestisitlerin meydana getirdiğı çevre kirliliğinin canlılar üzerinde bıraktıkları etkiler vurgulanmıştır (Archana vd., 2011).

Üner vd. (2006) tarafından, *Oreochromis niloticus* diazinon pestisitine maruz bırakılmış ve sonrasında çeşitli parametreler değerlendirilmiştir. Buna göre, subletal konsantrasyonların 1, 7, 15, 30 günlük uygulama periyotları sonucunda, AChE aktivitesinin önemli ölçüde baskılandığı, MDA seviyesinin 1. gün sonunda azaldığı fakat 7 ve 15. günlerde yükseldiğı 30. günde MDA seviyesinin değişmediğı ifade edilmiş kullanılan bu pestisit AChE üzerinde inhibisyon etkisi yarattığı vurgulanmıştır. Tüm bu ölçümlerin deney hayvanın beyin numunesinden elde edildiğı açıklanmıştır.

C. carpio, 14 gün boyunca fosalone maruz bırakılmış ve sonrasında balıkların fizyolojileri incelenmiştir. Buna göre *C. carpio* fosaldan olumsuz derecede etkilenmiş, anormal yüzüş şekilleri ve ölümler görülmüştür. Fosalonun belli dozlarının ciddi omurga deformasyonları oluşturduğu vurgulanmıştır (Çelik vd., 2012).

O. mossambicus'un fosalonun belirli konsantrasyonlarına belirli sürelerde maruz bırakıldığı bir çalışmada balıkların kan parametrelerindeki değişim tespit edilmiştir. Buna göre fosalon, eritrosit, lökosit sayılarında, hemogloblin içeriğı ve hematokrit değerlerinde önemli düzeylerde düşüşlere neden olmuştur (Ali vd., 2009).

Nereis diversicolor'un fosalone maruz kalma sonrasında CaE aktivitesi üzerindeki etkisinin tespit edildiğı bir başka çalışmada karbamat grubu pestisitlere göre içlerinde fosalonun da bulunduğı organofosforlu pestisitlerin CaE üzerinde inhibisyon etkisinin daha fazla olduğı ifade edilmiştir (Scaps vd., 1997).

Kısa süreli fosalone maruz kalan *O. mossambicus*'un solunum metabolizması incelenmiştir. Buna göre uygulama sonrasında beynin çeşitli dokularında hipoksik

koşulların ortaya çıktığı, enerji sentezinin inhibe olduğu ve LDH aktivitesinin arttığı vurgulanmıştır (Devaraj vd., 1993).

Rana tigrina'nın karaciğer ve bağırsak fosfatazları üzerine fosfalonun subakut toksisitesinin incelendiği bir çalışmada asit fosfataz (ACP) aktivitesinde azalış, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinde ise artış tespit edilmiştir. Fosfatazların bu aktivitesinin detoksifikasyon görevine engel oluşturduğu ifade edilmiştir (Ramalingam vd., 1990).

Organofosforlu pestisit olan paratyonun zebrabalıkları üzerinde AChE enzim aktivitesi, tüm vücut protein ve laktat içeriği, hayatta kalma, gelişme ve üremeye olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 250 gün boyunca pestisite maruz kaldıktan sonra bu parametreler değerlendirilmiştir. Buna göre pestisit uygulamasından kaynaklanan enzim inhibisyonu ölçülmüş ve bu etkinin maruz kalma süresiyle ilişkili değil konsantrasyona bağlı olduğu ifade edilmiştir. Hayatta kalma, üreme, gelişme ve laktat içeriği gibi parametrelerin bu maruz kalmayla etkilenmediği, protein konsantrasyonunun ise çok az miktarlarda etkilendiği açıklanmıştır (Erwin vd., 2003).

D. rerio, *Perna perna*, *Jenynsia multidentata*'nın test organizması olarak kullanıldığı bir çalışmada organofosfatlı pestisit olan glifosat uygulamasından sonra kullanılan test organizmalarının çeşitli dokularında AChE aktivitesi ölçülmüştür. Buna göre kullanılan tüm türlerde enzim inhibisyonu tespit edilmiş, bu pestiste en duyarlı canlının *P. perna*'nın diğer iki organizmaya göre daha hassas olduğu ifade edilmiştir (Juliana vd., 2013).

Organofosforlu pestisit olan triklorfon, sürfektan madde olan SDS (sodyum dedosil sülfat) ve bunların karışımının belirli konsantrasyonlarının karışımına maruz bırakıldığı *Tilapia nilotica*'da AChE, SOD, GSH, CAT, GST enzim aktivitelerinin incelendiği bir çalışmada, triklorfonun belli konsantrasyonlarının AChE ve GSH aktivitelerini önemli ölçüde inhibe ettiği, antioksidan enzimleri üzerinde önemli ölçüde değişime neden olmadığı ifade edilmiştir. SDS'in, AChE, GST ve CAT aktivitelerini inhibe ettiği açıklanmıştır. Triklorfon-SDS karışımının muhtemel additif etkisinden dolayı AChE aktivitesinde inhibisyonlara neden olduğu vurgulanmıştır (Feng vd., 2008).

D. rerio, *O. mykiss*, *P. reticulata*, *C. carpio* organofosforlu pestisit olan diazinon maruz bırakılmış ve AChE aktiviteleri değerlendirilip karşılaştırılmıştır. Buna göre, *C. carpio*'nun, diğer türlere nazaran diazinon toksistesine karşı daha

dirençli olduğu açıklanmıştır. Bu canlılarda biyoaktivasyonun daha düşük seviyelerde gerçekleştiği ve detoksifikasyon enzimlerinin nispeten daha yüksek aktivite gösterdiği sebep olarak ileri sürülmüştür. *O. mykiss*'in bu pestisite karşı çok hassas olduğu, *P. reticulata* üzerinde çok daha fazla toksik etki yarattığı ifade edilmiştir. *D. rerio*'nun ise kullanılan türler arasında bu pestisite en fazla direnç gösterdiği açıklanmıştır (Johannes vd., 1995).

Sparus aurata'ya azinfos metil, paratyon metil, klorpirifos metil, metamidofos ve diazinon gibi beş farklı organofosforlu pestisit uygulanmış ve bu pestisitlerin canlının kalbindeki AChE aktivitesi üzerine etkisi test edilmiştir. Buna göre; azinfos metil ve metamidofos kalp kulakçıklarında kolinerjik etkiyi arttırmış, atropin uygulamasıyla bu etkide %140 oranında geri dönüşüm sağlandığı ifade edilmiştir. Azinfos metilin bu pestisitler içerisinde en fazla antikolinesteraz aktivitesine etki ettiği vurgulanmıştır (Melpomeni vd., 2009).

Pseudorasbora parva, *Carassius auratus*, *O. mykiss* malatyon ve triazfos pestisitlerine maruz bırakılmış ve saflaştırılmış AChE enzim miktarları karşılaştırılmıştır. Buna göre, *P. parva*, *C. auratus*'ta en fazla inhibisyon oranı tespit edilmiş ve miktarlar arasındaki bu farklılığın türler arası farktan doğacağı ifade edilmiştir (Li vd., 2004).

Metil paratyon ve klorpirifos pestisitleri *P. reticulata*'ya belirli konsantrasyonlarda uygulanarak öncelikle LC₅₀ değerleri tespit edilmiş ve sonrasında çeşitli enzim aktiviteleri incelenmiştir. Her iki kimyasalın subletal konsantrasyonlarının oksidatif stresi arttırdığı açıklanmış, metil paratyonun beyinde, karaciğer ve solungaçta GSH seviyelerini azalttığı ifade edilmiş ve kontrol grubuna kıyasla her iki kimyasalın CAT, GST, GR ve SOD aktivitelerinde artış veya azalışlara sebep olduğu vurgulanmıştır (Archana vd., 2011).

Balık yetiştiriciliğinde ektoparazitlerin kontrolü için sıklıkla kullanılan insektisitlerden diflubenzurona maruz bırakılmış *P. lineatus*'da çeşitli parametreler incelenmiştir. Buna göre; 96 saat sonunda GST ve CAT aktivitesinin indüklendiği, kaslarda AChE aktivitesinde azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir (Lindalva vd., 2008).

Organofosforlu pestisitlerin etkilerini göstermek için yapılan bir çalışmada, malatyon, ve bunların karışımı kullanılmış, AChE ve CaE enzim aktiviteleri üzerine etkileri saptanmaya çalışılmıştır. Çalışmada somon balıkları (*Oncorhynchus kisutch*) kullanılmıştır. Pestisit karışımlarının belirli konsantrasyonlarının AChE aktivitesini

inhibe etmede sinerjistik etki yarattığı ifade edilmiş, daha düşük karışım konsantrasyonunun beyin AChE aktivitesini inhibe etmediği fakat CaE aktivitesinde azalışa neden olduğu vurgulanmıştır. CaE aktivitesinin bu pestisitlerin ayrı ayrı ya da karışım konsantrasyonlarına oldukça duyarlı olduğu bildirilmiştir (Cathy vd., 2014).

Rhinella arenarum larvaları azinfos metil ve karbaril pestisitlerine 48 saat süreyle belirli konsantrasyonlarda maruz bırakılmış, antioksidan enzimler, esterase aktiviteleri ve GSH seviyeleri tespit edilmiştir. AChE ve CaE enzim aktiviteleri her iki pestisit de ayrı ayrı uygulamasıyla önemli ölçüde inhibe olmuş, GST aktivitesi yükselmiş, CAT aktivitesi azalmış glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin ise pestisit uygulamasından etkilenmediği vurgulanmıştır (Ferrari vd., 2011).

Organofosforlu pestisit olan diklorvos, *Aphanius iberus*'un CaE aktivitesi ölçülmüş ve belirli düzeylerde inhibisyon tespit edilmiştir. Diklorvosun subletal konsantrasyonlarının bile önemli derecede CaE inhibisyonuna neden olduğu açıklanmış, beyin ile kas CaE düzeyleri ve inhibisyon dereceleri kıyaslanmıştır (Varo vd., 2008).

Sazan balıklarına atrazin, klorpirifos ve bunların karışımlarının uygulandığı bir çalışmada, 40 günlük maruz kalma süresinden sonra 20 günlük geri dönüşüm periyodu uygulanmıştır. Tüm bu uygulamalar sonunda asit fosfataz, alkalin fosfataz, Na^+/K^+ -ATPaz, SOD enzim aktiviteleri değerlendirilmiş, ayrıca MDA içeriği tespit edilmiştir. Bu parametreler için dalak ve böbrek organları kullanılmıştır. Çalışma sonucunda adı geçen enzim aktivitelerinde azalmalar tespit edilmiştir, çevre kirliliğinde kullanılacak biyobelirteçler tavsiye edilmiştir (Wang vd., 2013).

Klorpirifosa maruz bırakılan *O. niloticus*'ta oksidatif stres, steroid hormon konsantrasyonları ve AChE aktivitesinin belirlendiği bir çalışmada öncelikli olarak LC_{50} değerleri tespit edilmiş, sonrasında ise adı geçen parametreler incelenmiştir. Buna göre; maruz bırakıldıktan sonra serum östradiol, testosteron ve kortizol seviyelerinde önemli miktarda azalma görülmüştür. Bununla beraber, 30 gün maruz bırakıldıktan sonra GST aktivitesi baskılanmış ve SOD aktivitesi %215-446 oranları arasında artış göstermiştir. GPx ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak fark gözlenmemiş olup, gonadlarda AChE aktivitesinin %46-77 arasında azaldığı ifade edilmiştir. 15 günlük geri dönüşürlük periyodundan sonra östradiol ve testosteron seviyeleri kontrol grubuyla aynı seviyeye ulaşmış, GST ve SOD aktivitesinin ise baskılandığı vurgulanmıştır (Oruç, 2010).

2 gün akut klorpirifosa maruz bırakıldıktan sonra 35 günlük geri dönüşüm periyodu uygulanan *Lumbricus terrestris*'te kolinesteraz enzim aktivitesinin incelendiği bir çalışmada, organofosforlu pestisit olan klorpirifosun dokularda şiddetli inhibisyona neden olduğu, geri dönüşüm periyodu sonunda belirli düzeylerde CaE enzim aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir (Sandra vd., 2010).

Kavitha vd. (2008), tarafından yürütülen bir araştırmada klorpirifosun *G. affinis*'in antioksidan enzimlerine (SOD, CAT) ve AChE üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Pestisit LC₅₀ değeri tespitinden sonra uygulanan konsantrasyonlarda SOD, CAT, GR ve AChE aktiviteleri incelenen organa göre artış veya azalış göstermiştir. 16-18 günlük geri dönüşüm periyodundan sonra bu enzimlerin durumları değerlendirilmiştir. Buna göre AChE enziminin daha fazla geri dönüşüm süresine ihtiyaç duyduğu, bu pestisit adı geçen enzimler üzerinde inhibisyon etkisi yarattığı vurgulanmıştır.

Profenofos'un subletal konsantrasyonlarına *O. mossambicus* 28 gün boyunca maruz bırakılmış ve sonrasında 7 günlük geri dönüşüm periyodu uygulanmıştır. Solungaçlarda GST ve SOD aktivitesi yükselmiş, beyinde ise azalmıştır. CAT ve GR enzimleri solungaçlarda inhibe olmuş, redükte glutatyonun (GSH) tüm dokularda önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Geri dönüşüm periyodu sonunda incelenen parametrelerde artış ve azalışlar olduğu ifade edilmiştir (Kavitha vd., 2009).

Ferrari vd. (2004), azinfos metil, paratyon ve karbarile maruz bırakıldıktan sonra *Carassius auratus*'un beyin kolinesteraz aktivitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, azinfos metil ve paratyonun subletal konsantrasyonlarının 96 saatlik uygulaması sonucunda CaE aktivitesinde belirgin baskılanma gözlemlendiği, LC₅₀ konsantrasyonunda karbarilin %86'lık inhibisyona neden olduğu vurgulanmıştır. 96 saatlik geri dönüşüm periyodu sonunda karbaril ile inhibe olmuş enzimin %75'nin tekrar geri döndüğü bildirilmiştir, fakat organofosforlu pestisitler ile oluşturulan inhibisyon etkisinin ortadan kalkması için 35 günlük geri dönüşüm süresine ihtiyaç duyulacağı ifade edilmiştir. Bu enzimin, organofosforlu ve karbamatlı pestisitlerin akut ve subakut uygulamaları sonucunda iyi bir biyobelirteç olabileceği vurgulanmıştır.

Genç gökkuşağı alabalıklarında (*O. mykiss*) azinfos metil ve karbarilin kas ve beyinde kolinesteraz aktivitesine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, EC₅₀ değerlerine bakılarak azinfos metilin, karbarilden daha güçlü bir kimyasal olduğu sonucuna varılmıştır. Kas karboksilesterazının beyin karboksilesterazına oranla daha

az hassas olduğu vurgulanmış, kas karboksilesterazının EC₅₀ değerinin letal konsantrasyona daha yakın olduğu ifade edilmiştir. Karbarile maruz bırakıldıktan sonra geri dönüşüm periyodunun daha hızlı olduğu 21 günlük geri dönüşüm süresi boyunca azinfos metile maruz kalmanın CaE geri dönüşümünü sağlamadığı açıklanmıştır. 48 saat azinfos metile maruz bırakılmanın sonunda beyin ve kas CaE aktivitesinde önemli azalmaları tespit ettiği vurgulanmıştır (Ferrari vd., 2007).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Pestisitler

Çalışmada sentetik piretroit insektisitlerden sipermetrin ([Siyano-(3- fenoksifenil) metil]3-(2,2-dikloroetnil)-2,2-dimetilsiklopropan-1-karboksilat) ve organofosfat pestisitlerden fosalon (6-kloro-3-(dietoksifosfinotiyosülfonilmetil)-1,3-benzoksazol-2-) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan sipermetrin IMPERATOR 25EC ticari adı ile Syngenta tarafından, fosalon ise LANOFAN 35EC ticari adı ile Safa Tarım tarafından üretilen ve pazarlanan preparatlardır.

3.2. *Danio rerio* Bireylerinin Sağlanması

Deneyde kullanılan test organizmaları Singapur menşeli olup, yerel akvaryumculara ithal ettirilerek temin edildi. Laboratuar ortamına alınan balıklar, laboratuar koşullarına adapte olmaları için bir ay süre ile 28°C (±1) sıcaklık ve 14:10 saat aydınlık: karanlık fotoperiyodunda bakımları yapıldı. Adaptasyon esnasında günlük ölüm oranı %10'un da altında olduğu gözlemlendi. Balıklar düzenli olarak günde iki kez protein içeriği %50 olan balık yemi ile (Tropical D-50 plus Almanya) beslendi ve akvaryum suları düzenli olarak havalandırılarak bir iç temizleyici ile suyun filtrasyonu sağlandı. Ayrıca suyun % 25'i dinlendirilmiş su ile haftada bir yenilendi. Akvaryumlarda kullanılan su, %50 ters ozmos, %50 musluk suyu oranında olup, litre başına 0.5 gr kaya tuzu ilave edildi.

3.3. Toksisite Testlerinin Uygulanması

3.3.1. Pestisitlerin LC₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Deneyde kullanılan pestisitler olan sipermetrin ve fosalonun LC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla ön çalışmalar yapıldı. Bunun için önceden temin edilen 5L kapasiteli polikarbonat kaplara, kap başına üçer balık konarak sipermetrin için 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg/L, fosalon için de 1, 5, 10, 15, 20 mg/L konsantrasyonlarda olacak şekilde denemeler yapıldı. İlk denemelerde elde edilen

bilgiler ışığında LC₅₀ değerlerinin tespit edilmesi amacıyla esas çalışmalara başlandı. Ön çalışmalarda elde edilen bulgular ışığında sipermetrin için 1.24-30 µg/L ve fosalon için ise 1-5.38 mg/L doz aralıklarında çalışılması uygun görüldü. Uygun görülen doz aralıklarında ölüm oranları belirlendi. Probit analizi sonucuna göre, (probit v3.3 programı, EPA 2013) sipermetrin için 96 saatlik LC₅₀ değeri; 14.4 µg/L, fosalon için 96 saatlik LC₅₀ değeri 2.254mg/L olarak hesaplandı.

3.3.2. Subakut Toksisite Deneyleri

Yukarıda bahsedilen değerlerin tespitinden sonra her bir pestisit için LC_{50/2}, LC_{50/4}, LC_{50/10} dozları uygulama değerleri olarak seçilip, her doz için dört adet kap oluşturuldu, her kaba cinsiyet farkı gözetilmeksizin 14 adet balık konuldu. 96 saat boyunca belirlenen konsantrasyonlara maruz bırakılan balıklar için uygulama ortamı günlük olarak yenilendi. Pestisit uygulandığı esnada yemleme yapılmadı, 96.saatın sonunda ilk örnekler toplandı ve -80°C derin dondurucuda muhafaza altına alındı. Bu aşamadan sonra geri dönüşüm süreci başlatıldı ve kaplara pestisit uygulaması yapılmadan balıklar temiz su içerisinde yaşatılmaya devam edildi. Geri dönüşürlük sürecinin sağlıklı yürüyebilmesi amacıyla 2 gün aralıklarla ortamlar taze dinlenmiş su ile yenilendi ve düzenli olarak günlük yemleme yapılarak balıkların besin ihtiyaçları temin edildi. Uygulamanın 10. ve 20. gününde her kaptan 4 adet balık örneği alınmak üzere her doz uygulaması için toplam 16 adet balık örneği alındı ve toplanan örnekler buz anestezisine maruz bırakıldı, anestetik etkinin tam olarak oluşmasından sonra örnekler alüminyum folyolara sarılarak derin dondurucuya kaldırıldı. Enzimatik çalışmalara kadar -80°C derin dondurucuda bekletildi.

Her ikipestisit için ayrı ayrı yapılan bu işlem sonrasında karışım deneylerine geçildi. Bu aşamada uygulanan kombinasyonlar Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Bu kombinasyonların uygulanma şekilleri bir önceki paragrafta bahsedilen yöntemle gerçekleştirildi. Ancak pestisitlerin sinerjistik etkilerinden dolayı sipermetrin LC_{50/2}-fosalon LC_{50/2} kombinasyonunda 96 saatlik uygulama esnasında tüm balıklar öldü ve bu nedenle bu uygulama grubundan numune alınamadı. Diğer kombinasyonlar için 96 saatlik uygulama, 10. ve 20. günlük geri dönüşüm örnekleri yukarıda anlatıldığı gibi alındıktan sonra, -80°C derin dondurucuda saklandı.

Sipermetrin LC_{50/2}-fosalon LC_{50/2} kombinasyonunda yaşanan durum sebebiyle farklı kombinasyon uygulamasına karar verildi. Buna göre; sipermetrin LC_{50/4}-

fosalon LC_{50/4}, sipermetrin LC_{50/4}-fosalon LC_{50/10}, sipermetrin LC_{50/10}-fosalon LC_{50/4}, sipermetrin LC_{50/10}-fosalon LC_{50/10}, sipermetrin LC_{50/2}-fosalon LC_{50/10}, sipermetrin LC_{50/10}-fosalon LC_{50/2} kombinasyonları uygulanmaya başlandı, 96 saat boyunca belirlenen konsantrasyonlara maruz bırakılan balıklar için ortam hergün yenilendi. Buna bağlı olarak balık örnekleri yukarıda açıklanan yönteme göre toplandı.

Çizelge 3.1. Karışım kombinasyonları

KARIŞIM KOMBİNASYONLARI
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/2}
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/10}
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/2}
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/4}
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/10}
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/4}
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/10}

SPR: Sipermetrin, FSL: Fosalon

3.4. Ortam pH'sının Saptanması

Deneylerde statik yenilemeli test sistemi kullanıldığından, balıkların maruz kaldıkları ortamın pH değerleri de belirli aralıklarla ölçüldü. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda pestisit çözeltisi bulunan kaplar için 24., 48., 72., ve 96. saatlerdeki pH değerleri periyodik olarak kaydedildi. Böylece toksik etkinin ortamdaki pH değişimine bağlı olarak ortaya çıkıp çıkmadığının saptanması amaçlandı.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Seçilen enzimlerin aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçüm işlemleri, balıkların tüm vücut homojenizasyonu ve santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin mikroplaka okuyucu sistem (Versamax, Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak yapıldı. CAT enzimi okuması, kuvars küvet kullanılarak spektrofotometrik (Shimadzu, Japonya) olarak yapıldı. Enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçümlerinde, her bir örnek için üç tekrarlı absorbans okuması yapıldı. Aynı örnek için elde edilen değerler arasında % 10'dan daha büyük korelasyon farkı bulunduğunda, okuma işlemi yinelenildi (Güngördü, 2007). Bütün enzimlerin aktiviteleri, örneklerdeki toplam protein düzeyleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol/dk/mg total protein) cinsinden ifade edildi.

3.5.1. Balıkların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Örneklerin homojenizasyonuna başlamadan önce, balığın bulunduğu alüminyum folyo buz üzerinde çözölmeye bırakıldı ve su damlacıkları alındıktan sonra tartıldı. Homojenizasyon toplam balık ağırlığının 5 katı hacminde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.1 M, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) içinde yapıldı. Balık örnekleri buz kabı içinde cam-teflon homojenizatör (Heidolph RZ 2021) kullanılarak, 2000 rpm'de 30 saniye süreyle parçalandı. Homojenizasyon sonrası homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı. Homojenat 4°C'de 16.000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj (Sigma 2-16k) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak S16 fraksiyonlarında enzim aktiviteleri ölçüldü. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz içerisinde korundu (Güngördü, 2007).

3.5.2. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GST aktivitesini belirlemek amacı ile mikroplaka okuyucu sistem kullanıldı. Substrat olarak, %96'lık etanol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör olarak redükte glutasyon (GSH) (0.002 M) kullanıldı (Habig vd., 1974). Mikroplaka kuyucuklarına sırası ile 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5) + 100 µL GSH karışımı ve son olarak 10 µL CDNB pipetlendi. Karışım mikroplaka okuyucu sisteme

yerleştirildikten sonra 15 sn süre ile karıştırıldı ve 25°C’de 2 dakika süre ile 344 nm’de absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik GST aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.3. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GR aktivitesi tayini Cribb vd. (1989) tarafından kullanılan yöntemle göre yapıldı. Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150 µl 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 1.2 mM, 20 µl NADPH ve 20 µl örnek içermektedir. 20 µl, 3.25 mM GSSG’nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1 mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon ilerledikçe GSSG’dan GSH oluşumu nedeniyle azalan DTNB miktarı oda sıcaklığında 3 dakika süre ile 405 nm’de izlendi ve elde edilen absorbans değerlerinden spesifik GR aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı

3.5.4. Karboksilesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CaE aktivitesini belirlemek amacı ile önerilen spektrofotometrik yöntem mikroluka okuyucu sisteme uyarlandı. Aktivite tayininde 26 mM %96’lık etanol içinde hazırlanan p-nitrofenol asetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı (Nousiainen vd., 1984, Santhoskumar vd., 1999). Bu amaçla 5 µL örnek ve 250 µL, 0.05 M trizma pH 7.4 tamponu (Sigma-Aldrich, T7693) kuyucuklara pipetlendi ve 25°C’de 3 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 µL p-nitrofenol asetat kuyucuklara ilave edildi ve 2 dakika süreyle 405 nm’de OD okuması yapıldı. Kör olarak distile su kullanıldı. Spesifik CaE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.5. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Bu amaçla Ellman vd. (1961) tarafından kullanılan yöntemin, Özmen vd. (1998) tarafından modifiye edilmiş ve mikroluka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde asetilkolin iodid (ACTI) substrat olarak kullanıldı ve renk değişimine bağlı olarak ürün oluşumu saptandı. Balıklardan elde edilen süpernatant toplam reaksiyon karışımında 10 µl olacak şekilde mikroluka

kuyucuklarına pipetlendi. Süpernatantın üzerine son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ve 0.136 mM DTNB olacak şekilde, 0.1 M trizma pH 8.0 tamponu (Sigma-Aldrich, T8483) içerisinde hazırlanmış karışımdan 200 µl ilave edildi. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildi ve 10 saniye süreyle çalkalandı. 25°C’de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.6. Katalaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CAT aktivitesi Aebi (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Enzim aktivitesinin, 240 nm dalga boyunda substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) tüketimine bağlı olarak saptandı. Bu amaçla 1 ml’lik kuvarz küvete, 20 µl örnek ve 480 µl 12.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) pipetlendi. 25°C’de 1 dakika süreyle absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.7. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GPx aktivitesi Bell vd. (1985) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmiş ve mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde H_2O_2 substrat olarak, sodyum azid (NaN_3) ise katalaz inhibitörü olarak kullanıldı. Bu amaçla, mikrolaka kuyucuklarına 10 µl süpernatant ve 160 µl 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 ünite GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN_3 içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu pipetlendikten sonra bu karışım 20°C’de 6 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 30 µl 1.67 mM H_2O_2 pipetlenerek reaksiyon başlatıldı. NADPH oksidasyonuna bağlı olarak absorbans değişimi 25°C’de 3 dakika süreyle 340 nm’de kaydedildi. Spesifik GPx aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.8. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

LDH enzim aktivitesi ölçümünde, 340 nm dalga boyunda LDH diagnostik kiti (Biolabo cod; 92111, BIOLABO., Fransa), kit protokolünde belirtilen yöntem mikrolaka okuyucu sistem için modifiye edilerek kullanıldı. Toplam reaksiyon

karışımında 5µl süpernatant olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, LDH substratı hazırlandı. Bu çözeltiden 200µl, örneklerin üzerine seri olarak çok kanallı mikropipet ile pipetlendi. Karışım 5 saniye süreyle mikrolaka okuyucuda çalkalandı ve 25°C'de 2 dakika süre ile 340nm'de absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik LDH aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.9. Aspartat Aminotransferaz Aktivitesi

AST enzim aktivitesi ölçümünde, diagnostik kiti (Biolabo cod: 80025, BIOLABO., Fransa), kit protokolünde belirtilen yöntem mikrolaka okuyucu sistem için modifiye edilerek kullanıldı. Öncelikli olarak 20 µl süpernatant örneği mikrolaka çukurlarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, hazır kite 10mL distile su eklenerek içerisinde AST substratı bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon başlatıldı. Absorbans değişimi, 25°C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile okundu. Spesifik AST aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

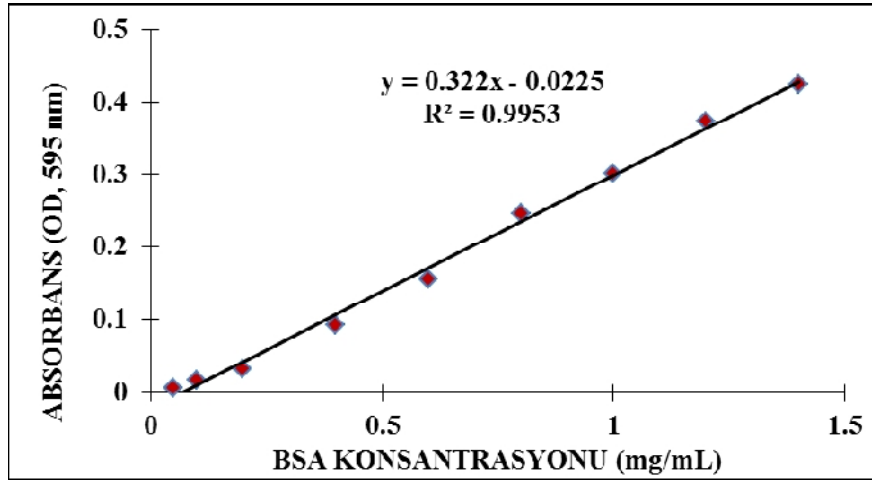
3.5.10. Alanin Aminotransferaz Aktivitesi

ALT aktivitesi ölçülürken, diagnostik kiti (Biolabo cod: 80027, BIOLABO., Fransa), kit protokolünde belirtilen yöntem mikrolaka okuyucu sistem için modifiye edilerek kullanıldı. Öncelikli olarak 20 µl örnek mikrolaka çukurlarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, hazır kite 10 mL distile su eklenerek içerisinde ALT substratı bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon karışımı 1 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 25 °C'de, 340 nm'de 2 dakika süre ile absorbans değişimi belirlendi. Spesifik ALT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.6. Toplam Protein Miktarı Tayini

Balık homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre, mikrolaka okuyucu sistem kullanılarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/4 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µl mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µl Bradford çözeltisi

(Sigma B6916, USA) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Örneklerdeki toplam protein değerleri bir bilgisayar paket programı (Slide) kullanılarak, elde edilen değerler ile BSA standart eğrisi (Şekil 3.1) değerleri karşılaştırılarak hesaplandı. Daha sonra sulandırım faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplandı. Elde edilen toplam protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan S16 fraksiyonları enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.



Şekil 3.1. BSA standart eğrisi

3.7. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistik paket programları kullanıldı. Balıklarda enzimatik analiz sonucunda elde edilen bulguların analizi için SPSS programı (SPSS Inc., USA), LC₅₀ (ortalama öldürücü konsantrasyon) değerlerinin saptanması için EPA tarafından geliştirilen Finney'in probit analizi paket programı (Finney, 1971) kullanıldı. Ölüm oranlarının ve enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az %95 olasılık ile ($p < 0.05$ için) önemli olarak değerlendirildi. Buna bağlı olarak, gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p < 0.05$ düzeyinde önem seviyesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında enzim

aktiviteleri için örnekler ikili karşılaştırma ile t-testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı. NOAEC değerinin hesaplanmasında ve ölüm oranları için örneklerin ikili karşılaştırılmasında Dunnett-t testi kullanıldı. Grup içi farklılığın $p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. 96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.1.1. 96 Saatlik LC₅₀ ve NOAEC Değerleri

Çalışmada ilk olarak sipermetrin (SPR) ve fosalon (FSL) pestisit/pestisit karışımı etkisine maruz bırakılan bireyler için 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC (ölüm etkisinin görülmediği en yüksek konsantrasyon) değerleri hesaplandı. İki ayrı pestisit ticari formülasyonları kullanıldığından, deneyde kullanılan LC_{50/2}, LC_{50/4}, LC_{50/10} konsantrasyonları ve NOAEC değerleri, pestisitlere ait ticari paketlerin üzerindeki % veya litredeki aktif etken madde miktarına göre hesaplandı. Elde edilen bulgular Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bu verilere göre, 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC konsantrasyonları bakımından Sipermetrin>Fosalon şeklinde bir sıralama yapılabilir.

Çizelge 4.1. Pestisitlerin 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC değerleri

Pestisit	LC ₅₀ (mg AI/L)	NOAEC (mg AI/L)
Sipermetrin	0.0144	0.01038
Fosalon	2.254	1.400

4.1.2. 96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri

Kullanılan pestisit çözeltilerinin pH değerleri, 24, 48, 72, 96 saatlerde ölü bireyler ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra kaplardaki çözeltiler yenilenmeden önce ölçülerek kaydedildi. 96 saatlik ortalama pH değişimleri çizelge 4.2. ve 4.3.'te verilmiştir. Çözelti pH'larının 96 saat sonundaki ortalama değerlerine göre, pestisit ve karışımlarının pH değerlerinde toksisiteyi etkileyecek düzeyde değişim belirlenmemiştir.

Çizelge 4.2. 96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri

Konsantrasyon(mg AI/L)	Sipermetrin	Fosalon
Kontrol	6.28(5.93-6.63)	6.62(6.25-6.69)
LC_{50/2}	6.18(5.90-6.45)	6.40(6.31-6.48)
LC_{50/4}	6.29(6.14-6.43)	6.40(6.31-6.49)
LC_{50/10}	6.25(5.94-6.38)	6.36(6.31-6.43)

Çizelge 4.3. 96 saatlik çalışmalarda karışımlardan elde edilen ortalama pH değerleri

Konsantrasyon(mg AI/L)	pH
Kontrol	6.28(6.18-6.62)
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/4}	6.14(6.10-6.26)
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/10}	6.29(6.28-6.36)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/4}	6.42(6.40-6.49)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/10}	6.31(6.29-6.38)
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/10}	6.27(6.17-6.37)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/2}	6.32(6.31-6.45)

SPR: Sipermetrin, FSL: Fosalon

LC_{50/2}: SPR için 0.0072 mg AI/L, FSL için 1.127 mg AI/L

LC_{50/4}: SPR için 0.0036 mg AI/L, FSL için 0.5635 mg AI/L

LC_{50/10}: SPR için 0.00144 mg AI/L, FSL için 0.2254 mg AI/L

4.2. 96 Saatlik Sipermetrin Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

96 saat süreyle Sipermetrin'in belirlenen konsantrasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireylerinde biyobelirteç olarak seçilen enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

GST enzim aktivitesinin sipermetrine maruz kalan 96 saat sonunda değişim gösterdiği tespit edildi. LC_{50/2} konsantrasyonunda yaklaşık olarak %57 oranında baskılanma gerçekleşirken LC_{50/4} uygulamasında aktivitenin %84 oranında arttığı tespit edildi. LC_{50/10} uygulamasında GST aktivitesi yaklaşık %80 oranında artış gösterdi. Tespit edilen tüm GST aktiviteleri istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir (p<0.001).

Çalışmalar sonucunda sipermetrin uygulanan balıklarda CaE enzimi tüm konsantrasyonlarda baskılandı ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bulundu ($p<0.001$). En düşük CaE aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak %76 oranında baskılanma ile LC_{50/4} uygulamasında tespit edildi. LC_{50/2} uygulamasında enzim aktivitesi yaklaşık %71 oranında inhibe olurken, LC_{50/10} uygulamasında ise aktivitenin kontrol balıklarına göre yaklaşık %47 oranında daha düşük düzeyde olduğu saptandı.

AChE, pestisit in uygulandığı tüm konsantrasyonlarda inhibisyona uğradı. En yüksek aktivite kaybı yaklaşık %81 ile LC_{50/2} uygulamasında tespit edilirken, LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %72 oranında enzim inhibisyonu tespit edildi ($p<0.001$). LC_{50/10} uygulamasında ise enzim aktivitesinde yaklaşık %14'lük bir kayıp gözlemlendi, ancak bu aktivite kaybının istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olmadığı saptandı.

Belirlenen sipermetrin konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *D. rerio* bireylerinde oksidatif stresin düzeyini ortaya koymak için biyobelirteç olarak kullanılan, GR, CAT, GPx enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

GR enzimi sipermetrin uygulamasına bağlı olarak tüm dozlarda inhibe oldu. En düşük GR aktivitesi LC_{50/4} uygulamasında saptandı ve değerin kontrol grubundaki balıklardaki GR enzim aktivitesinden %81 oranında daha düşük düzeyde olduğu hesaplandı. Ölçülen aktivitenin istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık gösterdiği bulundu ($p<0.001$). Enzim, LC_{50/2} ve LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık olarak %73 oranında inhibisyona uğradı ve istatistiksel olarak her iki konsantrasyon da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bulundu ($p<0.001$).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CAT, LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %5 oranında azalırken, LC_{50/4} uygulamasında enzim aktivitesinde bir değişime yol açmadı. Buna karşın LC_{50/10} uygulamasında ise CAT aktivitesinin yaklaşık %7'lik artış gösterdiği saptandı. Tüm konsantrasyonlarda elde edilen veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir farklılık göstermedi.

GPx aktivitesinin pestisite maruz kalan tüm konsantrasyonlarda baskılandığı saptandı. En düşük GPx aktivitesi LC_{50/4} uygulamasında ölçülerek yaklaşık %43 oranında bir inhibisyon oranı tespit edildi ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu azalışın önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0.001$).

Metabolizma hasarının belirlenmesi amacıyla, 96 saat boyunca sipermetrin insektisitine maruz kalan *D. rerio* bireylerinde ALT, AST, LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

ALT enzim aktivitesi, sipermetrine maruz kalan bireylerde konsantrasyonlara bağlı olarak değişimler gösterdi. En yüksek ALT aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık %33 oranında arttığı LC_{50/10} uygulamasında görülen değişimin istatistiksel olarak ta önemli olduğu bulundu ($p<0.001$). Aynı şekilde LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %22 oranında ve LC_{50/4} uygulamasında ise %32 oranında artışlar tespit edildi ve adı geçen konsantrasyonlardaki ALT enzim aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli oranda arttı ($p<0.05$ ve $p<0.001$).

AST, sipermetrine maruz kalma sonucunda tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre inhibisyona uğradı. En düşük AST aktivitesi %34 oranında azalış ile LC_{50/4} uygulamasında bulunurken ($p<0.001$), LC_{50/2} uygulamasında 326.5nmol/dk/mg protein olarak ve LC_{50/10} uygulamasında 328.1nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı ($p<0.05$).

LDH pestisitinin tüm konsantrasyonlarına maruz kalan balıklarda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir artış göstermiş olmakla birlikte, bu artışların istatistiksel olarak önemli düzeyde olmadığı görülmektedir.

4.3. Sipermetrin Toksisitesinde 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresinin Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

D. rerio bireylerinin 96 saat süreyle sipermetrin insektisitine maruz kalan balıklarda, maruz kalma süresinden sonra uygulanan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresinin sonunda seçilen enzim aktivitelerinde gözlenen değişimler Çizelge 4.4'te verilmiştir. Buna göre;

GST enzimi 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında, LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda enzim aktivitesinin %10 düşük olduğu, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %17 daha düşük düzeyde olduğu tespit edildi. Bu verilerin istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bir fark gösterdiği görülmektedir ($p<0.001$). LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %14 ve %62 düzeyinde bir artış söz konusudur. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu artışlar önemli düzeydedir

($p<0.001$). LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %13 artış gösterirken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %267 düzeyinde artış tespit edildi.

96 saat sipermetrine maruz kalan grup ile karşılaştırıldığında CaE aktivitesinde, LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %1.4 ve %35 düzeyinde artış kaydedildi. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %167 artış gösterirken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %115 artış elde edildi. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %41 düzeyinde artmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %13 azalmıştır. Geri dönüşüm süreleri sonunda ölçülen enzim aktiviteleri istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$).

AChE enzim aktivitesi 96 saat pestisite maruz kalan balıklarla karşılaştırıldığında şöyledir; LC_{50/10} uygulamasında enzim aktivitesi 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda sırasıyla %13 ve %39 azaldı. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %28 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise enzim aktivitesi %48 artış kaydetti. LC_{50/2} uygulamasında ise 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %30 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %26 azalış gösterdi. Saptanan veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bulundu ($p<0.001$).

Oksidatif stres varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süreyle sipermetrine maruz kalan *D. rerio* bireylerinin 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda GR, CAT ve GPx aktivitelerindeki değişim Çizelge 4.4'te verilmiştir.

GR enzim aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda hesaplanan veriler 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında; LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %16 ve %8 artış gösterdi. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %61 artmışken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %40 arttı. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %16 artmasına karşın, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %35 azaldı. Tüm veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$).

96 saatlik sipermetrin insektisitine maruz kalmayı takip eden geri dönüşüm süreleri sonunda CAT aktivitesinde azalışlar kaydedildi. LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %32 azalmış, 20 günlük geri dönüşüm

süresi sonunda ise bu azalış %0.28 düzeyinde gerçekleşmiştir. LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivite sırasıyla %26 ve %7 azalmıştır. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %3, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %46 azalış tespit edildi. LC_{50/2} uygulamasındaki 10 ve 20 günün sonundaki veriler, istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.05$ ve $p<0.001$).

Geri dönüşüm süreleri sonunda saptanan GPx aktiviteleri 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında şöyledir; LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda enzim aktivitesi artmıştır. Bu artışlar sırasıyla, %43 ve %3 oranındadır. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %35, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %286 artmıştır ($p<0.001$). LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivite azalmıştır. Bu azalışlar sırasıyla, %21 ve %41 düzeyindedir.

Metabolizma hasarının belirlenmesi amacıyla, *D. rerio* bireylerine 96 saat sipermetrine maruz kalma süresinden sonra uygulanan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresinin ALT, AST, LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Geri dönüşüm süreleri sonunda ALT aktivitesi 96 saat pestisite maruz kalan balıklarla karşılaştırıldığında bazı konsantrasyonlarda artmış, bazılarında ise azalmıştır. LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %11 artmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %6 azalmıştır ($p<0.05$). LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %8, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %36 artmıştır ($p<0.01$). LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %57 artmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %42 azalmıştır ($p<0.001$).

AST aktivitesi 96 saat pestisite maruz kalan bireyler ile karşılaştırıldığında; LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %8 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %32 azalış kaydedildi ($p<0.001$). LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %29 azalmış ($p<0.01$), 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %26 artmıştır ($p<0.01$). LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %6 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %30 azalış kaydedildi ($p<0.001$).

LDH enzim aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda artış ve azalışlar kaydedildi. LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %15

artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %5 azalış göstermiştir ($p<0.01$). $LC_{50/4}$ uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %15 ve %28 artış tespit edildi. $LC_{50/2}$ uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %21 artış ($p<0.05$), 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %22 azalış kaydedildi ($p<0.001$).

Çizelge 4.4. Sipermetrin uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi (nmol/dk/mg protein±standart hata)

Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	CAT	GPx	ALT	AST	LDH
96. Saat Kontrol	15	34.7±1.4	658.8±24.8	436.8±24.3	8.95±0.46	26.51±2.25	20.1±1.8	26.97±1.25	414.4±37.3	606.7±42.5
10.gün Kontrol	16	52.1±2.4	784.7±55.9	631.3±38.3	13.06±1.09	17.95±2.39	21.7±5.5	38.28±2.03	330.7±22.0	671.6±33.9
20.gün Kontrol	16	57.8±3.2	756.1±39.2	606.3±39.1	13.50±0.63	25.87±2.74	14.1±2.1	41.18±1.77	371.4±19.9	877.1±55.9
LC_{50/10} (96. saat)	16	62.6±2.7*** (%80↑)	349.8±87.1*** (%47 ↓)	375.4±74.1 (%14 ↓)	2.37±0.22*** (%73 ↓)	28.41±2.93 (%7↑)	19.3±2.2 (%4 ↓)	35.89±1.74*** (%33↑)	328.1±18.9* (%21↓)	672.4±32.5 (%11↑)
LC_{50/10} (10.gün)	16	55.8±1.5*** (%7 ↑)	354.9±67.2*** (%55 ↓)	325.3±59.7*** (%48 ↓)	2.75±0.15*** (%79 ↓)	19.35±1.13 (%8↑)	27.6±3.0 (%27↑)	39.88±2.61 (%4↑)	355.6±24.2 (%8 ↑)	776.8±46.5 (%16 ↑)
LC_{50/10} (20.gün)	16	51.7±1.8 (%11 ↓)	474.4±68.8*** (%37 ↓)	229.5±43.8*** (%62 ↓)	2.56±0.27*** (%81↓)	28.33±1.34 (%10↑)	19.9±2.5 (%41↑)	33.78±2.19* (%18 ↓)	222.0±23.3*** (%40↓)	638.5±42.1** (%27↓)
LC_{50/4} (96. saat)	16	63.7±2.2*** (%84 ↑)	156.0±12.1*** (%76 ↓)	123.5±13.2*** (%72 ↓)	1.70±0.08*** (%81 ↓)	26.51±1.63 (%0)	11.4±1.7*** (%43 ↓)	35.73±1.32*** (%32↑)	272.8±12.3*** (%34↓)	640.0±32.3 (%5↑)
LC_{50/4} (10.gün)	16	72.9±2.2*** (%40 ↑)	418.5±58.5*** (%47 ↓)	157.0±26.0*** (%75 ↓)	2.74±0.23*** (%79 ↓)	19.74±1.75 (%10 ↑)	15.4±2.3 (%29↓)	38.85±2.26 (%1.5↑)	194.4±41.3** (%41↓)	738.7±43.2 (%10 ↑)
LC_{50/4} (20.gün)	16	80.1±2.9*** (%28 ↑)	336.0±55.2*** (%56↓)	183.0±38.3*** (%70 ↓)	2.38±0.14*** (%82 ↓)	24.71±1.81 (%4 ↓)	44.1±3.1 *** (%212↑)	48.44±1.81** (%18↑)	344.7±16.4 (%7 ↓)	818.9±28.7 (%7↓)
LC_{50/2} (96. saat)	16	14.8±0.9*** (%57 ↓)	193.3±13.4*** (%71 ↓)	81.6±10.4*** (%81 ↓)	2.39±0.33*** (%73↓)	25.14±1.68 (%5↓)	17.0±5.2 (%15↓)	32.77±2.10* (%22 ↑)	326.5±19.5* (%21 ↓)	648.6±28.0 (%7↑)
LC_{50/2} (10.gün)	16	16.8±1.2*** (%68 ↓)	273.8±30.4*** (%65↓)	106.3±16.0*** (%83 ↓)	2.77±0.28*** (%79 ↓)	24.38±1.98* (%36↑)	13.4±2.7 (%38↓)	51.44±3.73 (%34 ↑)	345.9±21.4 (%5 ↑)	784.6±42.1* (%17 ↑)
LC_{50/2} (20.gün)	16	54.4±4.3 (%6 ↓)	168.5±20.0*** (%78 ↓)	60.9±14.4*** (%90 ↓)	1.53±0.18*** (%89 ↓)	13.51±1.92*** (%48 ↓)	10.0±2.3 (%29 ↓)	23.83±2.54*** (%42 ↓)	226.4±18.5*** (%39 ↓)	504.6±25.2*** (%42↓)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

↑:Enzim aktivitesindeki artışı ifade etmektedir ↓:Enzim aktivitesindeki baskılanmayı ifade etmektedir

10 ve 20.gün enzim aktivitesi değerleri, pestisit uygulamasının sona ermesini takiben geri dönüşürlük değerlerini içermektedir

4.4. 96 Saatlik Fosalon Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

96 saat boyunca seçilen Fosalon konsantrasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireylerinde detoksifikasyon ve nörotoksisite belirteçleri olan GST, CaE, AChE enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.5'te verilmiştir.

GST enzim aktivitesinde; LC_{50/2} uygulamasında %60 oranında artış tespit edildi. LC_{50/4} uygulamasında %96 oranında artış tespit edildi ve bu artış tespit edilen en yüksek oran olarak bulundu. LC_{50/10} uygulamasında %84 oranında artış tespit edildi. Tüm konsantrasyonlardaki değişim istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$).

CaE; LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %84 oranında baskılandı ve bu oran tespit edilen oranlar içerisinde en yükseğidir. LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %78 ve LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık %79 oranında baskılanma tespit edildi. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlardaki değişim $p<0.001$ düzeyinde önemlidir.

AChE aktivitesi fosalon insektisine maruz kalan tüm konsantrasyonlarda baskılandı. LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %95 oranında baskılanma tespit edildi ve bu baskılanmanın diğer konsantrasyonlara göre en fazla olduğu bulundu. LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %93 ve LC_{50/10} uygulamasında %89 oranında baskılanmalar tespit edildi. Enzim aktivitesinde görülen bu baskılanmalar istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda önemli düzeydedir ($p<0.001$).

Oksidatif stresin varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süreyle belirlenen Fosalon konsantrasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireylerinde GR, CAT ve GPx aktivitelerindeki değişimi Çizelge 4.5'te verilmiştir.

GR enziminde, LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %80 oranında baskılanma tespit edildi. LC_{50/4} uygulamasında %78 oranında ve LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık %70 oranında baskılanmalar bulundu. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlardaki değişimin önemli düzeyde olduğu tespit edildi ($p<0.001$).

CAT aktivitesi LC_{50/2} ve LC_{50/4} uygulamasında artış gösterdi ve bu artışlar sırasıyla %55 ve %33 oranındadır. Elde edilen bu artışlar istatistiksel olarak önemli düzeydedir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık %17 oranında

baskılanma tespit edildi, istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir düzeyde önemli olmadığı anlaşıldı.

GPx enziminde en yüksek aktivite yaklaşık %77 oranı ile LC_{50/2} uygulamasında ölçüldü. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde olduğu tespit edildi ($p<0.001$). LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %48 oranında artış tespit edilirken ($p<0.01$), LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık %40 oranında aktivite kaybı tespit edildi ($p<0.01$).

Metabolizma hasarının belirlenmesi amacıyla, 96 saat süreyle Fosalonun belirlenen konsantrasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireylerinde ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.5. 'te verilmiştir.

ALT enzim aktivitesinde, LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %83 oranında artış tespit edilirken bu oran diğer konsantrasyonlar içerisindeki en yüksek artıştır ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$). LC_{50/4} ve LC_{50/10} uygulamasında sırasıyla %76 ve %57 oranında artış tespit edildi, her iki aktivite değeri istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.001$).

AST aktivitesinde en düşük değer; LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %40 oranında tespit edildi ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$). LC_{50/2} ve LC_{50/10} uygulamalarında sırasıyla yaklaşık %25 ve %34 oranında baskılanma tespit edildi ($p<0.001$ ve $p<0.05$).

LDH enzimi LC_{50/2} uygulamasında yaklaşık %25 oranında artmıştır. Bu artış istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.05$). LC_{50/10} uygulamasında yaklaşık %31 oranında baskılanma saptandı ve bu baskılanmanın konsantrasyonlar arasında en fazla orana sahip olduğu tespit edildi ($p<0.001$). LC_{50/4} uygulamasında yaklaşık %27 oranında baskılanma tespit edildi ($p<0.01$).

4.5. Fosalon Toksisitesinde 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresinin Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Detoksifikasyon ve nörotoksisite derecesini ortaya koymak için 96 saat süreyle belirlenen FSL konsantrasyonlarına maruz bırakılan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda *D. rerio* bireylerinde ölçülen GST, CaE ve AChE aktiviteleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

GST enzim aktivitesi 96 saat pestisite maruz kalan balıklar ile karşılaştırıldığında LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %10, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %12 artış gösterdi. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %20 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %1 azaldı. LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %5 ve %10 artış gösterdi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde bulundu ($p<0.05$ ve $p<0.001$).

Belirlenen geri dönüşüm süreleri sonunda CaE enzim aktivitesinde artış saptandı. LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivite sırasıyla %236 ve %343 arttı. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitede %188, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %120 artış tespit edildi. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %0.18 artış hesaplanırken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise aktivitede 96 saate göre değişim tespit edilemedi. Ölçülen enzim aktivite değerlerinde tespit edilen farklar istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p<0.001$).

96 saat fosalon insektisine maruz kalan balıklar ile geri dönüşüm süreleri sonundaki balıklar AChE enzim aktivitesi bakımından karşılaştırıldığında aktivitede belirgin değişimlerin olduğu saptandı. LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %199 ve %195 artış olduğu tespit edildi. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %322 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %294 artış kaydedildi. LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %9 ve %33 azalış tespit edildi. Belirtilen sürelerin sonunda kaydedilen veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$).

Oksidatif stres varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süresince belirlenen FSL konsantrasyonlarına maruz bırakılan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda *D. rerio* bireylerinde ölçülen GR, CAT ve GPx aktivitelerindeki değişim Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çalışmamız esnasında uyguladığımız geri dönüşüm süreleri sonunda 96 saat fosalone maruz kalan bireylere göre geri dönüşüm gruplarında GR aktivitesinde farklı miktar ve oranlarda değişimler kaydedildi. LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %9 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %5 azaldı. LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri

sonunda sırasıyla %42 ve %18 oranında artış tespit edildi. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %31, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %43 artış tespit edildi ($p<0.001$).

Geri dönüşüm sürelerinin CAT enziminin aktivitesinde artış veya azalışlara neden olduğu saptandı. LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %32 ve %50 artış gösterdiği görülmektedir. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %14 yüksek iken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %12 daha düşüktür. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitenin %48 azaldığı, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %54 oranında daha düşük bir değerde olduğu tespit edildi. Bulgularımız ışığında aktivite değerlerinin istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çeşitli düzeylerde önemli farklar gösterdiği saptandı ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

GPx aktivitesi 96 saat pestisite maruz kalan balıklarla karşılaştırıldığında LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %24 azalmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %144 artmıştır. LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %20 ve %32 azalış olduğu hesaplandı. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %32 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %17 azalış tespit edildi ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

Metabolizma hasarının belirlenmesi amacıyla, *D. rerio* bireylerine 96 saat fosalone maruz kalma süresinden sonra uygulanan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresinin ALT, AST, LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.5'te verilmiştir.

ALT aktivitesi 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında LC_{50/10} konsantrasyonunda 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda artış gösterdi. Bu artışlar sırasıyla %11 ve %7 olarak tespit edildi. LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite artarken (%15), 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise azaldı (%27). LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %6 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %1.4 artış tespit edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli bulundu ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$).

AST enzim aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda artma ve azalmalar gerçekleşti. LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda

aktivite azaldı (%7 ve %12). LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitede %18 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %9 azalış tespit edildi. LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %31 ve %16 azalış hesaplandı ($p<0.01$ ve $p<0.001$).

LDH aktivitesinde de değişimler görülmektedir. LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivite artış gösterdi (%20 ve %22). LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %20 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %4 azaldı. LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda LDH aktivitesinde %55, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %47 azalma tespit edildi ($p<0.01$ ve $p<0.001$).

Çizelge 4.5. Fosalon uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi (nmol/dk/mg protein±standart hata)

Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	CAT	GPx	ALT	AST	LDH
96. Saat Kontrol	15	34.7±1.4	658.8±24.8	436.8±24.3	8.95±0.46	26.51±2.25	20.1±2.8	26.97±1.25	414.4±37.3	606.7±42.5
10.gün Kontrol	16	52.1±2.4	784.4±55.9	631.3±38.3	13.06±1.09	17.95±2.39	21.7±5.5	38.28±2.03	330.7±22.0	671.6±33.9
20.gün Kontrol	16	57.8±3.2	756.1±39.2	606.3±39.1	13.50±0.63	25.87±2.74	14.1±2.1	41.18±1.77	371.4±19.9	877.1±55.9
LC_{50/10} (96. saat)	16	63.9±4.3*** (%84 ↑)	138.7±11.0*** (%79↓)	49.7±3.8*** (%89 ↓)	2.70±0.17*** (%70 ↓)	21.99±1.70 (%17↓)	12.1±2.0** (%40 ↓)	42.23±1.83*** (%57 ↑)	312.4±19.5* (%25 ↓)	421.2±15.5*** (%31 ↓)
LC_{50/10} (10.gün)	16	70.2±2.6*** (%35 ↑)	466.1±49.6*** (%41↓)	148.7±15.6*** (%76 ↓)	2.93±0.16*** (%78↓)	29.08±2.56** (%62 ↑)	9.2±1.2* (%58↓)	46.80±2.95* (%22 ↑)	291.6±17.4 (%12↓)	506.8±25.5*** (%25↓)
LC_{50/10} (20.gün)	16	71.8±1.8*** (%24 ↑)	614.7±59.8 (%19 ↓)	146.8±13.5*** (%76 ↓)	2.56±0.15*** (%81↓)	33.02±1.72* (%28↑)	29.5±2.4*** (%109 ↑)	45.02±2.05 (%9↑)	275.4±24.2** (%26↓)	512.5±17.9*** (%42 ↓)
LC_{50/4} (96. saat)	16	68.1±3.0*** (%96 ↑)	146.4±6.3*** (%78 ↓)	30.0±2.0*** (%93 ↓)	1.97±0.12*** (%78 ↓)	35.16±2.96* (%33 ↑)	29.7±2.9** (%48↑)	47.39±2.10*** (%76 ↑)	248.5±26.0*** (%40 ↓)	444.9±34.5*** (%27 ↓)
LC_{50/4} (10.gün)	16	81.7±4.5*** (%57↑)	420.9±55.3*** (%46 ↓)	126.5±17.4*** (%80 ↓)	2.80±0.21*** (%79 ↓)	39.97±4.27*** (%123 ↑)	23.8±3.0 (%10↑)	54.26±3.82*** (%42 ↑)	292.6±21.4 (%12↓)	536.1±34.4** (%20 ↓)
LC_{50/4} (20.gün)	16	67.4±2.3* (%17 ↑)	322.0±43.5*** (%57 ↓)	118.2±20.1*** (%81 ↓)	2.34±0.17*** (%83 ↓)	31.13±2.59 (%17 ↑)	20.1±3.9 (%43 ↑)	34.73±1.69* (%16 ↓)	270.2±21.7** (%27 ↓)	428.3±29.5*** (%51↓)
LC_{50/2} (96. saat)	16	55.5±1.6*** (%60 ↑)	108.6±4.3*** (%84 ↓)	19.8±2.3*** (%95 ↓)	1.80±0.14*** (%80 ↓)	41.20±2.94*** (%55 ↑)	35.5±3.1*** (%77 ↑)	49.34±4.48*** (%83↑)	273.2±14.5*** (%34 ↓)	758.2±37.3* (%25↑)
LC_{50/2} (10.gün)	16	58.5±2.6 (%12 ↑)	108.8±7.6*** (%86 ↓)	18.0±2.5*** (%97 ↓)	2.35±0.12*** (%82↓)	21.38±2.23 (%19 ↑)	24.1±3.8 (%11↑)	46.46±1.78** (%21 ↑)	188.6±13.7*** (%43 ↓)	339.4±13.7*** (%49↓)
LC_{50/2} (20.gün)	16	61.1±0.7 (%6↑)	108.6±10.4*** (%86↓)	13.3±1.7*** (%98↓)	2.58±0.13*** (%81 ↓)	19.12±1.25* (%26↓)	29.4±3.6*** (%109↑)	49.99±1.35*** (%21 ↑)	229.8±12.3*** (%38 ↓)	400.5±12.5*** (%54 ↓)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

↑:Enzim aktivitesindeki artışı ifade etmektedir ↓:Enzim aktivitesindeki baskılanmayı ifade etmektedir

10 ve 20.gün enzim aktivitesi değerleri, pestisit uygulamasının sona ermesini takiben geri dönüşürlük değerlerini içermektedir

4.6. 96 Saatlik Pestisit Karışımlarının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Sipermetrin (SPR) ve Fosalon (FSL) uygulamasının $LC_{50/2}$ değerlerinin 1:1 oranındaki karışımları tüm balıkların ölümüne sebep olduğu için, bu konsantrasyonlardaki pestisit karışımlarına maruz kalan balık örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

Seçilen SPR+FSL kombinasyonunun tüm konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *D. rerio* bireylerinde detoksifikasyon ve/veya nörotoksisite belirteçleri olan GST, CaE ve AChE enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

GST aktivitesinde en yüksek artış %188 oranında SPR $LC_{50/2}$ + FSL $LC_{50/10}$ karışımında tespit edilirken, istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın önemli düzeyde olduğu tespit edildi ($p<0.001$). SPR $LC_{50/10}$ + FSL $LC_{50/2}$ karışımında yaklaşık %49 oranında baskılandığı gözlemlendi ($p<0.001$). Bu konsantrasyona maruz kalan balıklar haricindeki tüm konsantrasyonlarda enzim aktivitesinde değişik oranlarda artış tespit edildi ($p<0.001$).

CaE aktivitesi tüm konsantrasyonlarda pestisit karışımlarına maruz kalma sonucu baskılandı. Bu inhibisyon düzeylerinin istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olduğu bulundu ($p<0.001$). En düşük aktivite %83 oranında baskılanan SPR $LC_{50/10}$ + FSL $LC_{50/2}$ karışımında saptandı.

AChE, balıklarda tüm pestisit karışımı uygulama gruplarında önemli düzeyde inhibisyona uğradı ($p<0.001$). Enzim inhibisyonunun en yüksek düzeyde olduğu SPR $LC_{50/10}$ + FSL $LC_{50/2}$ karışımında %95'lik bir baskılanma olduğu saptandı.

D. rerio bireylerinde 96 saatlik SPR + FSL karışımına maruz bırakılması sonucunda oksidatif stres biyobelirteçleri olan GR, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

GR enzim aktivitesi, SPR+FSL karışımının bütün konsantrasyonlarına maruz kalması sonucunda baskılandı ve bu inhibisyonlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.001$). En düşük GR aktivitesi yaklaşık %78 oranında inhibe olan SPR $LC_{50/10}$ + FSL $LC_{50/2}$ karışımında saptandı.

CAT aktivitesinin SPR+FSL karışımının bütün konsantrasyonlarına maruz kalma sonucunda arttığı tespit edildi ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında önemli olduğu saptandı ($p<0.001$). En yüksek CAT aktivitesi %118 oranında SPR LC_{50/10} + FSL LC_{50/2} karışımında tespit edildi.

GPx aktivitesinde 96 saat karışım kombinasyonlarına maruz kalma süresinden sonra aktivasyon ve inhibisyonlar gerçekleşti. En yüksek GPx aktivitesi SPR LC_{50/10} + FSL LC_{50/10} karışımında yaklaşık %47 oranında gözlemlendi ($p<0.01$).

D. rerio bireylerinin 96 saat süreyle belirlenen çeşitli karışım konsantrasyonlarına maruz kalması sonucu oluşabilecek metabolizma hasarını ortaya koyabilmek amacıyla biyobelirteç olarak kullanılan ALT, AST, LDH aktivitelerindeki değişim Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Karışımların tüm konsantrasyonlarında ALT aktivitesinde aktivasyon tespit edildi. En yüksek ALT aktivitesi, kontrol grubuna göre yaklaşık %61 artış ile SPR LC_{50/10} + FSL LC_{50/2} karışımında saptandı. SPR LC_{50/10} + FSL LC_{50/4} karışımında istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir düzeyde fark bulunamadı. SPR LC_{50/2} + FSL LC_{50/10} karışımında ise %36 oranında artış tespit edildi ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.01$). Bu karışım konsantrasyonlarının haricindeki tüm konsantrasyonlardaki farklılık istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeydedir ($p<0.001$).

AST aktivitesinde tüm karışım konsantrasyonlarında baskılanma tespit edildi. En düşük aktivite yaklaşık %67 oranında SPR LC_{50/2} + FSL LC_{50/10} karışımında tespit edilirken istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemlidir ($p<0.001$). Aktiviteler arasında en az baskılanma yaklaşık %31 oranında SPR LC_{50/4} + FSL LC_{50/10} karışımında saptandı, istatistiksel olarak $p<0.01$ düzeyinde önemli bulundu. Diğer karışım kombinasyonlarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.01$ ve $p<0.001$ düzeyinde önemli olduğu tespit edildi.

LDH aktivitesinde; en yüksek artış yaklaşık %23 oranında SPR LC_{50/10} + FSL LC_{50/10} karışımında hesaplandı ve istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu tespit edildi ($p<0.05$). SPR LC_{50/4} + FSL LC_{50/4} karışımında ise yaklaşık %18 oranında baskılanma tespit edildi ($p<0.05$).

4.7. Pestisit Karışımlarının 10 ve 20 Günlük Geri Dönüşüm Süresi Sonunda Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

96 saat süreyle belirlenen Sipermetrin (SPR)+Fosalon (FSL) konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda *D. rerio* bireylerinde detoksifikasyon ve nörotoksisite belirteçleri olan GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri Çizelge 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

Geri dönüşüm sürelerinin sonlanmasını takiben balık gruplarında GST enzim aktivitesi 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında değişim gösterdi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %8 ve %7 azalmıştır. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitede %3, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %19 azalma tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda artış saptandı (%14 ve %10). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %36, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %30 artış tespit edildi. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivite sırasıyla %18 ve %16 artış gösterdi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %14, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %17 artış tespit edildi. Çalışmalarımız ışığında elde ettiğimiz aktivite değerleri istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir (p<0.001).

CaE aktivitesi 96 saat pestisit karışım kombinasyonlarına maruz kalan balıklar ile karşılaştırıldığında tüm karışım kombinasyonlarında artış gösterdi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %90, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %113 arttı. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %459 ve %369 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda artış saptandı (%51 ve %24). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %157, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %320 artış tespit edildi. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %410, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %165 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda artış %11 iken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %400 olarak saptandı (p<0.01 ve p<0.001).

AChe enzim aktivitesi geri dönüşüm süreleri sonunda belirgin düzeyde artış gösterdi. 96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %81, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %120 artış hesaplandı. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede artışlar tespit edildi (%412 ve %339). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %97, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %185 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %278 ve %311 artış hesaplandı. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %457 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %464 arttı. En yüksek oranda aktivite artışı SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} kombinasyonunda saptandı. 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %76 artış tespit edilirken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %526 oranında artış tespit edildi (p<0.001).

Oksidatif stresin varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süreyle belirlenen SPR+FSL konsantrasyonlarına maruz bırakılan 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda *D. rerio* bireylerinde GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri Çizelge 4.7. ve 4.8’de verilmiştir.

Karışım kombinasyonlarının geri dönüşüm süreleri sonunda GR aktivitesinde artışlar tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} kombinasyonunda 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %40, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %0.36 arttığı tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitede %78, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %3 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %25 ve %50 oranında artış saptandı. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %16, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %34 artış tespit edildi. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %47 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %92 artmıştır. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda artış saptandı (%21 ve %54). Elde edilen veriler istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli olduğu bulundu (p<0.001).

Geri dönüşüm süreleri sonundaki balıklar 96 saat karışım kombinasyonları uygulanan balıklar ile karşılaştırıldığında CAT aktivitesinde artış ve azalışların olduğu saptandı. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi

sonunda %41, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %41 azalış tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede azalışlar hesaplandı (%37 ve %39). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %51 ve %4 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %0.26 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %0.73 azalış hesaplandı. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %3 artmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %37 azalmıştır. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %21 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %9 artış saptandı. Bulgularımızda ortaya çıkan farklılığın istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyde olduğu belirlendi (p<0.05, p<0.01 ve p<0.001).

96 saat karışım kombinasyonlarına maruz kalan balıklar ile karşılaştırıldığında GPx aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda artış ve azalışlar tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} kombinasyonunda 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %11, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %48 azalış hesaplandı. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} kombinasyonunda 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %10 artarken, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %47 azaldı. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %26 ve %7 azalış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %15, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %13 azalış saptandı. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %40 ve %35 artış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %34, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %6 artış saptandı.

Metabolizma hasarının belirlenmesi amacıyla, 96 saat Sipermetrin (SPR)+Fosalon (FSL) karışımının belirli konsantrasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireylerinde 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresinden sonra ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.7 ve 4.8’de verilmiştir.

96 saatlik uygulama ile karşılaştırıldığında ALT aktivitesinde değişimler şu şekildedir: SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %10 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %17 azalış tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %32 ve %8 artış saptandı. SPR LC_{50/10}+ FSL

LC_{50/4} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda artış tespit edildi (%31 ve %24). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %10 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %3 artış tespit edildi. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %18, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %16 artmıştır. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %11 ve %9 azalış tespit edildi.

AST aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda değişimler tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %8, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %36 azalmıştır. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede sırasıyla %37 ve %29 azalış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %26 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %61 azalış saptandı. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %14 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %33 artış hesaplandı. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda aktivitede azalmalar tespit edildi (%17 ve %3). SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %19, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %7 azalış saptandı.

96 saat karışım kombinasyonlarına maruz kalan *D. rerio* bireyleri ile karşılaştırıldığında LDH enzimi aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda artış ve azalışlar tespit edildi. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/4} kombinasyonunda 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %2 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %4 azalış saptandı. SPR LC_{50/4}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %7 azalmış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %2 artmıştır. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/4} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %21 artış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %0.32 azalış tespit edildi. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda sırasıyla %20 ve %13 azalış hesaplandı. SPR LC_{50/2}+ FSL LC_{50/10} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite %16, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda %2 artmıştır. SPR LC_{50/10}+ FSL LC_{50/2} uygulamasında 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivitede %14 azalış, 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise %3 artış tespit edildi.

Çizelge 4.6. 96 Saatlik karışım uygulamasının enzim aktivitelerine olan etkisi (nmol/dk/mg protein±standart hata)

Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	CAT	GPx	ALT	AST	LDH
Kontrol	15	34.7±1.4	658.8±24.8	436.8±24.3	8.95±0.46	26.51±2.25	20.1±1.8	26.97±1.25	414.4±37.3	606.7±42.5
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/4}	16	78.7±2.8*** (%127 ↑)	125.9±6.5*** (%81↓)	43.1±2.7*** (%90↓)	2.72±0.20*** (%70↓)	42.75±3.10*** (%61↑)	26.8±2.6* (%33 ↑)	37.29±2.13*** (%38 ↑)	281.0±26.9** (%32 ↓)	497.1±30.9* (%18 ↓)
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/10}	16	79.7±2.3*** (%130↑)	119.4±9.7*** (%82↓)	51.0±4.5*** (%88 ↓)	2.58±0.19*** (%71 ↓)	56.86±4.81*** (%114↑)	18.0±4.3 (%10↑)	35.72±1.90*** (%32 ↑)	285.6±18.5** (%31 ↓)	640.7±29.0 (%6↑)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/4}	16	68.7±3.4*** (%98 ↑)	118.0±6.3*** (%82↓)	33.7±2.5*** (%92↓)	2.04±0.15*** (%77 ↓)	34.14±3.35 (%29 ↑)	15.0±1.6* (%25↓)	31.05±2.42 (%15↑)	212.6±14.6*** (%49 ↓)	609.8±57.2 (%0.5 ↑)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/10}	16	77.3±2.9*** (%123 ↑)	158.2±7.4*** (%76↓)	53.2±3.5*** (%88↓)	2.91±0.17*** (%67↓)	38.16±1.70*** (%44↑)	29.6±2.9** (%47 ↑)	41.19±1.67*** (%53↑)	241.8±21.6*** (%42↓)	747.2±37.6* (%23↑)
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/10}	10	100.0±3.9*** (%188↑)	131.5±11.6*** (%80 ↓)	67.2±7.6*** (%85 ↓)	2.12±0.22*** (%76 ↓)	49.61±3.51*** (%87↑)	15.3±2.3 (%24↓)	36.73±2.78*** (%36 ↑)	135.9±22.0*** (%67 ↓)	628.7±43.6 (%4↑)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/2}	10	17.6±1.0*** (%49↓)	110.0±9.4*** (%83↓)	20.4±1.9*** (%95↓)	1.95±0.21*** (%78 ↓)	57.68±4.62*** (%118 ↑)	16.8±4.4 (%16↓)	43.50±2.99*** (%61 ↑)	215.4±25.6*** (%48 ↓)	623.3±46.5 (%3 ↑)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

↑:Enzim aktivitesindeki artışı ifade etmektedir ↓:Enzim aktivitesindeki baskılanmayı ifade etmektedir

Çizelge 4.7.Pestisit karışım uygulamasının 10 günlük geri dönüşüm süresinin enzim aktivitelerine olan etkisi (nmol/dk/mg protein±standart hata)

Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	CAT	GPx	ALT	AST	LDH
Kontrol	15	52,1±2,4	784,7±55,9	631,3±38,3	13,06±1,09	17,95±2,39	21,7±5,5	38,28±2,03	330,7±22,0	671,6±33,9
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/4}	16	68,0±3,1*** (%31↑)	239,1±24,5*** (%70↓)	78,0±7,8*** (%88 ↓)	3,80±0,79*** (%71 ↓)	25,15±2,62 (%40↑)	23,8±3,2 (%10↑)	41,14±2,22 (%7 ↑)	259,7±17,4* (%21 ↓)	506,1±25,5*** (%25 ↓)
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/10}	16	77,7±3,4*** (%49 ↑)	667,3±46,6*** (%15↓)	261,1±18,1*** (%59 ↓)	4,59±0,30*** (%65 ↓)	36,09±2,32*** (%101 ↑)	19,8±3,3 (%8 ↓)	47,17±2,14** (%19 ↑)	180,6±12,6*** (%45 ↓)	598,7±37,1 (%11 ↓)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/4}	16	78,7±5,5*** (%51 ↑)	177,8±15,8*** (%77 ↓)	66,2±6,4*** (%90 ↓)	2,56±0,24*** (%80 ↓)	51,66±7,64*** (%188↑)	11,1±2,6 (%49 ↓)	40,59±2,00 (%6 ↑)	267,1±26,8 (%19↓)	736,7±27,4 (%10 ↑)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/10}	16	105,4±4,7*** (%102 ↑)	407,2±44,2*** (%48 ↓)	201,1±24,4*** (%68 ↓)	3,39±0,19*** (%74 ↓)	38,26±3,49*** (%113↑)	25,1±2,5 (%16↑)	37,23±1,90 (%3 ↓)	207,0±20,6*** (%37 ↓)	601,9±39,1 (%10 ↓)
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/10}	10	118,3±6,1*** (%127↑)	670,9±71,2*** (%15 ↓)	374,0±21,5*** (%41 ↓)	3,12±0,28*** (%76↓)	51,20±3,52*** (%185↑)	21,4±2,4 (%1 ↓)	43,37±2,07 (%13 ↑)	112,9±24,8*** (%66 ↓)	731,4±58,0 (%9 ↑)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/2}	10	20,0±0,9*** (%62↓)	121,7±7,8*** (%84 ↓)	36,0±3,5*** (%94 ↓)	2,35±0,18*** (%82 ↓)	45,72±2,21*** (%154↑)	22,5±4,5 (%4 ↑)	38,68±2,64 (%1 ↑)	174,5±17,0*** (%47 ↓)	537,4±48,0* (%20 ↓)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

↑:Enzim aktivitesindeki artışı ifade etmektedir ↓:Enzim aktivitesindeki baskılanmayı ifade etmektedir

Çizelge 4.8.Pestisit karışım uygulamasının 20 günlük geri dönüşüm süresinin enzim aktivitelerine olan etkisi (nmol/dk/mg protein±standart hata)

Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE	GR	CAT	GPx	ALT	AST	LDH
Kontrol	15	57,8±3,2	756,1±39,2	606,3±39,1	13,50±0,63	25,87±2,74	14,1±2,1	41,18±1,77	371,4±19,9	877,1±55,9
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/4}	16	72,7±2,4*** (%26↑)	267,6±44,0*** (%65↓)	95,2±8,7*** (%84↓)	2,73±0,16*** (%80 ↓)	25,01±2,88 (%3 ↓)	14,0±1,1 (%0.7 ↓)	30,91±2,06*** (%25 ↓)	180,6±23,8*** (%51↓)	479,7±34,3*** (%45 ↓)
SPR LC_{50/4}-FSL LC_{50/10}	16	64,6±2,2 (%12↑)	559,7±57,5** (%26↓)	223,8±16,6*** (%63↓)	2,67±0,22*** (%80↓)	34,75±1,85* (%34↑)	9,5±2,0 (%33 ↓)	38,50±1,69 (%7 ↓)	203,7±13,1*** (%45 ↓)	651,7±37,7** (%26 ↓)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/4}	16	75,7±2,8*** (%31 ↑)	264,0±37,9*** (%65 ↓)	96,2±14,3*** (%84 ↓)	3,04±0,14*** (%77 ↓)	35,45±2,59* (%37↑)	14,0±4,2 (%0.7 ↓)	38,46±2,39 (%7 ↓)	82,1±16,1*** (%78 ↓)	607,8±41,2*** (%31 ↓)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/10}	16	101,0±2,1*** (%75 ↑)	663,6±56,2 (%12 ↓)	218,8±13,6*** (%64 ↓)	3,89±0,20*** (%71 ↓)	37,88±2,35** (%46 ↑)	25,8±2,5*** (%83 ↑)	42,23±1,78 (%3 ↑)	322,2±29,3 (%13 ↓)	650,0±28,0*** (%26 ↓)
SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/10}	10	116,8±8,5*** (%102↑)	348,9±32,7*** (%54↓)	378,8±33,3*** (%38 ↓)	4,08±0,26*** (%70 ↓)	31,28±2,37 (%21 ↑)	20,7±4,3 (%47 ↑)	42,62±1,88 (%3 ↑)	132,4±28,3*** (%64 ↓)	643,9±51,7** (%27↓)
SPR LC_{50/10}-FSL LC_{50/2}	10	20,7±0,9*** (%64 ↓)	550,3±58,7** (%27 ↓)	127,8±12,4*** (%79↓)	3,00±0,19*** (%78↓)	62,67±7,23*** (%142 ↑)	30,0±2,3*** (%113↑)	39,61±3,11 (%4 ↓)	200,1±20,8*** (%46 ↓)	639,7±52,0** (%27 ↓)

*:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel önemi göstermektedir

↑:Enzim aktivitesindeki artışı ifade etmektedir ↓:Enzim aktivitesindeki baskılanmayı ifade etmektedir

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Literatürde pestisit toksisitesi ile ilgili çalışmalar bulunmasına rağmen, pestisit karışımlarının subletal etkilerinin organizmalarda geri dönüşürlüğü konusunda çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Doğal ortamlarda kontaminasyona bağlı olarak pestisitler kimyasal karışımlar halinde bulunabilirler ve bu nedenle karışımların subletal dozlarının toksik etkilerinin belirlenmesi önem taşır. Bunun yanı sıra organizmalarda pestisite maruz kalmaya bağlı olarak toksik etkinin geri dönüşürlüğünün saptanması, bir ekosistemde olası etkilerin daha detaylı değerlendirilebilmesi açısından önemlidir.

Bu çalışma, tarımsal alanlarda yaygın olarak kullanılan iki insektisit olan sipermetrin (SPR) ve fosalon (FSL)'un *in vivo* koşullarda tek tek ve karışım halinde *D. rerio* bireylerinde ortaya çıkan akut subletal toksik etkilerini araştırmak, tek başlarına ve karışım halinde kullanıldıklarında toksik etkinin geri dönüşürlüğünün mümkün olup olmadığının belirlenmesi amacı ile düzenlenmiştir. Böylece çalışma, hem seçilen pestisitlerin hedef olmayan balıklar üzerinde sinerjistik ya da antagonistik etkisinin olup olmadığı hem de seçilmiş biyobelirteç enzimlerin uygun biyobelirteçler olup olmadıklarını anlamayı amaçlamıştır. Bu sebeple, öncelikle kullanılan pestisitlerin tek tek kullanımı ve sonrasında karışım halinde iken ortaya çıkan akut toksik etkileri ve sonrasında geri dönüşürlük süreçlerindeki değişimler tartışılmaktadır.

Çalışma için seçilmiş olan pestisitlerin tarım arazilerindeki uygulama alanları fazladır. Fakat bu pestisitlerin suda dağılım oranları hızlı ve yarı ömürleri ise kısadır. Bu nedenle *D. rerio*'da akut, subletal dozlarının toksik etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Biyokimyasal parametreler üzerine seçilen pestisitlerin kısa süreli etkilerinin değerlendirilmesi çevresel koşullar altında bu kimyasallara ait toksik etki mekanizmasının anlaşılması için bir bilgi teşkil edebilir. Bununla birlikte çalışmamızda uygulanan pestisitlerin karışım halinde olduklarında tek başlarına olan etkilerine göre oldukça düşük konsantrasyonlarda dahi daha toksik oldukları belirlenmiştir. Bu durumda bir ekosistemde pestisit karışımları kontaminasyonuna bağlı olarak ekolojik riskin önemli düzeyde artabileceğini göstermektedir.

Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda sipermetrin ve fosalon insektisitlerinin *D. rerio*'da LC₅₀ değerleri sırasıyla 0.0144 ve 2.254 mg AI/L olarak belirlenmiştir. Özellikle sipermetrinin LC₅₀ değerinin düşük olması, bu pestisit balıklar için daha toksik etkiye sahip olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

Yaptığımız literatür çalışmasına göre çalışmamızda kullanılan OP pestisit olan FSL'nin *D. rerio* için önceden belirlenmiş bir LC₅₀ değeri bulunmamaktadır. FSL için saptadığımız 96 saatlik LC₅₀ değerine (2.254 mg AI/L) bağlı olarak pestisit WHO tarafından yapılan risk sınıflandırması orta dereceli risk kategorisinde değerlendirilmesini gerektirmektedir. OP pestisitlerinden paratyonun sucul organizmalarda toksik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada *D. rerio*'da LC₅₀ değerini 1.85 mg AI/L olarak bulunmuştur ve bu değer bizim bulgularımız ile paralellik göstermektedir (Erwin vd., 2003). Çalışmamızda, SPR'nin *D. rerio* için bulunan 96 saatlik LC₅₀ değeri 0.0144 mg AI/L'dir ve bu değere göre pestisit WHO'ya göre, orta dereceli risk kategorisinde yer almaktadır. Literatür incelendiğinde; Ghousia (2005), *C. batrachus*'ta sipermetrinin LC₅₀ değerini 0.21 mg AI/L olarak bulmuştur. *C. carpio*'da sipermetrinin 24 saatlik LC₅₀ değeri 1.86 mg AI/L olarak tespit edilmiştir (Suvetha vd., 2010). *D. magna*'da sipermetrinin 24 saatlik LC₅₀ değeri 0.002 mg AI/L olarak bulunmuştur (Martins vd., 2007). Sipermetrin ile yapılan bir çalışmada *H. fossilis*'te LC₅₀ değeri 0.0072 mg AI/L olarak tespit edilmiştir (Diwakar vd., 2005). Buna göre *D. rerio*'nun diğer türlere göre insektisite daha duyarlı olduğu görülmektedir.

SPR'nin, diğer piretroitler gibi voltaj kapılı sodyum iyon kanalları üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Narahashi vd., 1996). SPR, sodyum kanallarının α alt ünitelerine bağlanarak kanalın aktivasyon ve inaktivasyon hızını yavaşlattığı, kanalın daha fazla açık kalmasının daha fazla sodyum iyon geçişine yol açtığı, bu durumun sürekli uyarıya yol açarak toksik etkiyi arttırdığı ifade edilmektedir (Shafer vd., 2005).

SPR; balıklarda, arılarda ve sucul böceklerde yüksek toksik etkiye sahiptir. Geniş spektrumlu olması nedeniyle hedef organizmaların yanı sıra faydalı böcekler ve hayvanları da etkilemektedir (Pascual vd., 1992). Balıklar sipermetrine karşı oldukça duyarlıdır (Stephenson vd., 1982). Diğer taraftan sipermetrine sıklıkla maruz kalan böceklerin bu insektiside karşı hızlı bir şekilde dirençlilik geliştirdiği rapor edilmiştir (Martinez-Cabrillo vd., 1991).

Buna karşın, fosalon organofosfat grubuna ait bir pestisit ve organofosfatlar, bir nörotransmitter olan asetilkolinin düzenlenmesinde rol oynayan asetil kolin esteraz enzimine (AChE) geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve inhibe eder (Marrs, 1996).

Organofosfatlı bileşiklerin ilk hedefi asetilkolin esteraz (AChE) enzimidir ve B-esterazlar, asetilkolinin hidrolize olmasında fizyolojik rol oynarlar. Asetilkolin, merkezi ve çevresel sinir sisteminde görev alan ana nörotransmitterdir. Asetilkolin, kolinerjik sinir uçlarından salınır ve sadece AChE tarafından hidrolize olur. Diğer nörotransmitterlerin aksine kolin, sadece asetil kolinin AChE tarafından hidrolize edilmesiyle açığa çıkar. OP (organofosfat) 'li kimyasallar AChE'yi inhibe eder, böylece kolinerjik sinapslarda asetilkolin birikmeye başlar. Bunun sonucunda, nikotinik ve muskarinik reseptörlerde çok yüksek seviyede uyarılma olur. Bu uyarılma, 'kolinerjik sendrom' olarak adlandırılır (Klaassen, 2008).

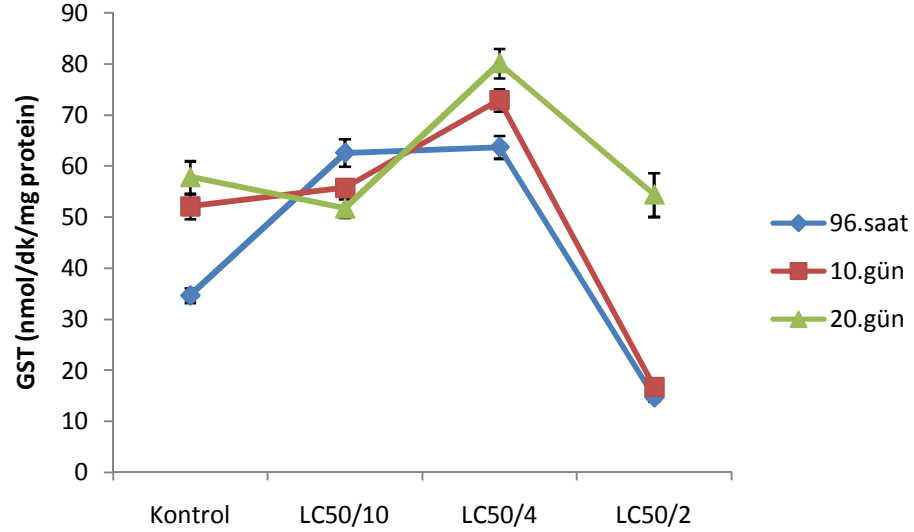
AChE inhibisyonunda temel mekanizma, OP'li bileşiklerin enzimin aktif merkezinde bulunan serin ile reaksiyona girmesidir. Bu reaksiyon bir kez gerçekleşikten sonra enzim inhibisyonu ortaya çıkar ve bu inhibisyonun geri dönüşümü çok düşük düzeyde gerçekleşir (Thompson vd., 1999).

Bu maddelerin toksik etkilerinin anlaşılmasında çeşitli enzimlerin aktivitelerinde gözlenen değişimler bize önemli bilgiler sağlayabilir. Piretroitler ve OP insektisitlerinin etki mekanizmalarının farklı olması nedeniyle tek başlarına kullanıldıklarında görünen toksik etkiler ile birlikte kullanıldıklarında gözlenen etkiler karşılaştırıldığında hem kolinesteraz üzerinde hem de ATPaz üzerine olan etkileri sonucunda çok düşük subletal konsantrasyonlarda dahi yüksek toksik risklerin ortaya çıkmasına yol açtığı elde ettiğimiz verilerden açıkça görülmektedir.

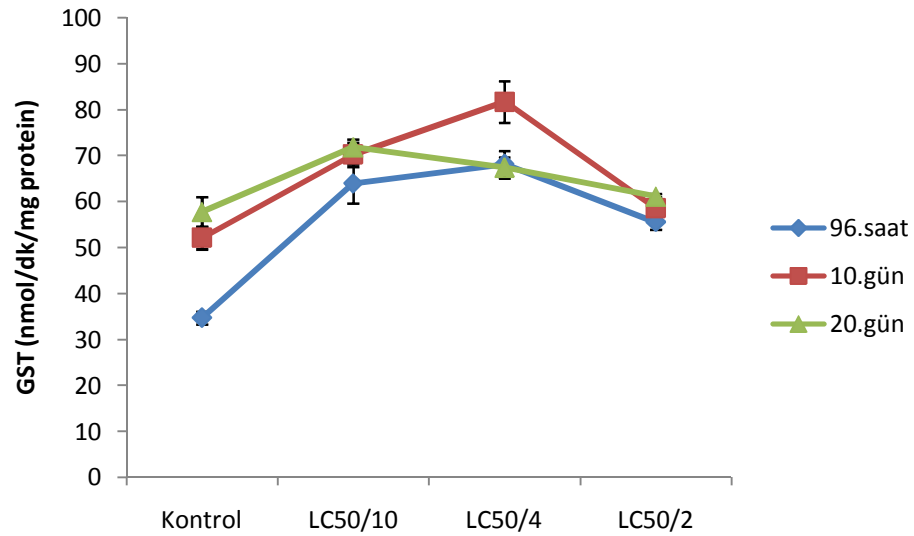
Çok çeşitli sayı ve yapıda ksenobiyotiğin canlılar üzerinde etkilerinin belirlenmesinde GST enzimi oldukça kullanışlı biyobelirteçlerdendir. Hücresel detoksifikasyon olaylarında önemli roller üstlenen ve faz II detoksifikasyon mekanizmasının ana enzimi olan GST, toksik ajanları suda çözünür hale getirip nötralize eder. Yaptığımız çalışmada SPR'nin LC_{50/2} konsantrasyonu haricinde diğer konsantrasyonlarda GST aktivitesinin arttığını görmekteyiz (Şekil 5.1). GST aktivitesinde artışların gözlenmesi, kirleticilerin neden olduğu strese organizmanın gösterdiği bir adaptasyon olarak düşünülebilir (Güngördü, 2007). Ensibi vd. (2013) *C. carpio*'nun deltametrine maruz kalmasından sonra GST aktivitesinde önemli artışlara neden olduğunu ve bu artışların organizmada strese bağlı olarak

dokularındaki enzimlerde değişimlere neden olduğunu vurgulamışlardır. Aydın-Sinan vd. (2012), piretroit grubuna dahil deltametrine maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında GST aktivitesinin azaldığını ve bu pestisitlerin organizmada detoksifikasyon yollarında modifikasyona sebep olduğunu belirtmişlerdir.

96 saat süreyle FSL'ye maruz kalan, ardından 10 ve 20 günlük geri dönüşüm sürelerinde incelenen *D. rerio*'da GST aktivitesi tüm konsantrasyonlarda ve tüm uygulama süreleri sonunda artış göstermektedir (Şekil 5.2). Metil paratyon ve klorpirifosa maruz kalan *P. reticulata*'da doza bağlı olarak GST aktivitesinin arttığı ifade edilmiştir. Kullanılan pestisitlerin ROS (reaktif oksijen bileşikleri) oluşumuna katkıda bulunduğunu pestisitlere maruz kalan organizmalarda GST indüksiyonunun strese karşı organizmayı koruduğunu bildirmektedir (Arcahana vd., 2011). Lindalva vd. (2008), diflubenzuron uygulamasından sonra *P. lineatus*'ta GST aktivitesinde artış gözlemlemişlerdir, diflubenzuronun yarattığı oksidatif strese bağlı olarak GST'ye etkide bulunduğunu, GST indüksiyonunun diflubenzuron veya metabolitlerinin metabolize edilmesi için faz II ksenobiyotik metabolizmasında konjugasyon reaksiyonlarını indükleyebileceğini ifade etmişlerdir. Bir başka çalışmada organofosfat grubuna dahil profenofosun subletal konsantrasyonları *O. mossambicus*'a uygulanmış, GST aktivitesi solungaçlarda artmış, geri dönüşüm süreleri sonunda ise aktivitelerde artış ve azalışlar tespit edilmiştir (Kavitha vd., 2009). Ferrari vd. (2011), *R. arenarum* larvalarını azinfos metil ve karbaril pestisitlerine 48 saat boyunca belirli konsantrasyonlarda maruz bırakmış ve GST aktivitesinin yükseldiğini bu artışın da oksidatif strese bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, GST aktivitesindeki artış kirleticilerin yarattığı strese organizmanın oluşturduğu yanıt olarak düşünülebilir.



Şekil 5.1. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GST enzim aktivitesi

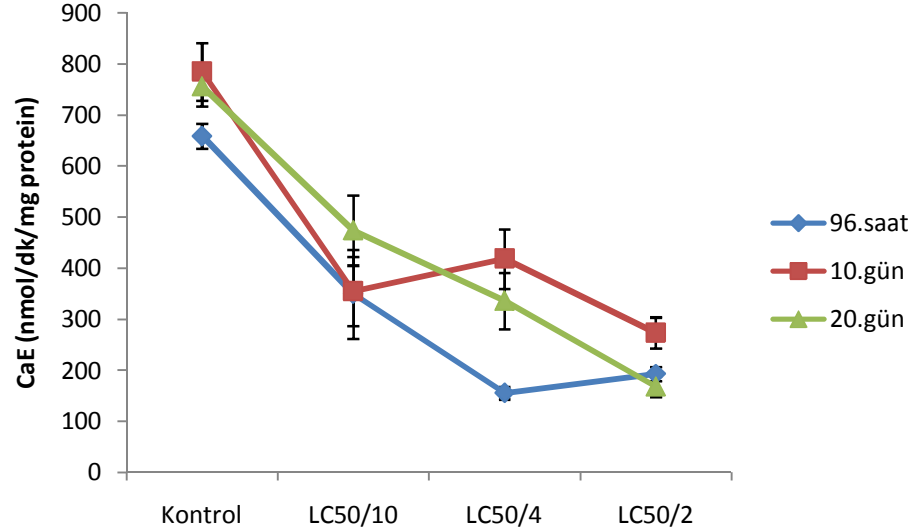


Şekil 5.2. 96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GST enzim aktivitesi

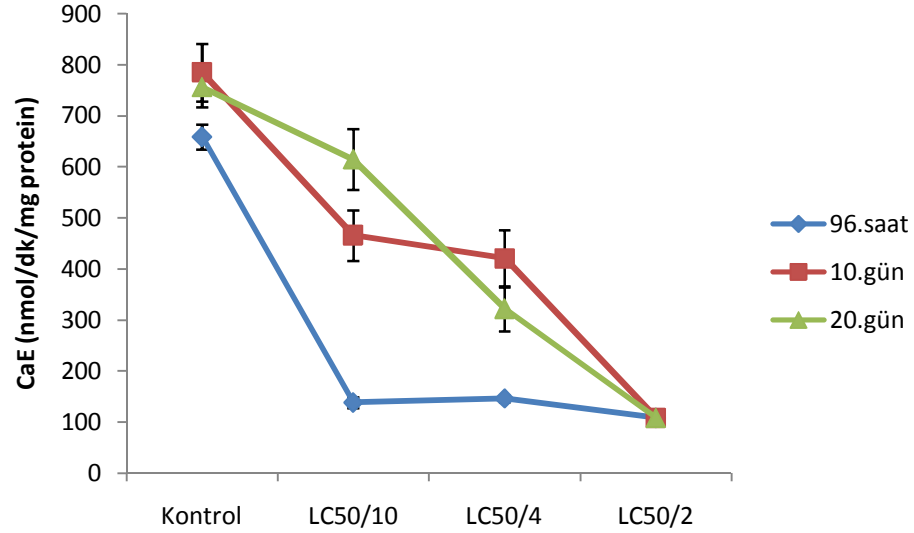
Araştırma sonuçlarımıza göre 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda SPR'ye maruz kalan bireylerde CaE aktivitesinde önemli düzeylerde inhibisyon görülmektedir ($p < 0.001$). Daha önce farklı pestisit ve farklı organizmalarla yapılan çalışmalarda da CaE aktivitesinde inhibisyonlar tespit edilmiştir. Aydın-Sinan vd. (2012), deltametrin ve λ -siyalotrinin *X. laevis* iribaşlarında CaE aktivitesinde önemli baskılanmaya yol açtığını ve λ -siyalotrinin ani felce yol açarak organizmayı ölüm sürecine götürdüğünü bildirmişlerdir. Ferrari vd. (2007), gökkuşağı alabalıklarında azinfos metil ve karbarilin CaE aktivitesinde baskılanmaya neden olduğunu, 21

günlük geri dönüşüm süresinin bu inhibisyonu ortadan kaldıramadığını vurgulamış, bu sürenin uzamasının enzimin reaktivasyonunun çok yavaş gerçekleşmesiyle ilişkilendirilebileceğini ifade etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ve elde ettiğimiz veriler de bu konuda paralellik göstermiş, uygulanan geri dönüşüm süreleri sonunda enzim aktivitesindeki inhibisyonun ortadan kalkmasına yeterli olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 5.3). CaE enziminde genel olarak görülen aktivite kaybının balıkların ölüm periyoduna girmelerinin bir sonucu olarak düşünülebilir (Aydın-Sinan, 2012).

Yaptığımız çalışmada FSL uygulamasının CaE enzim aktivitesinde önemli inhibisyonlara neden olduğu görülmektedir (Şekil 5.4). Cathy vd. (2014), malatyona maruz kalan *Oncorhynchus kisutch*'da CaE enzim aktivitesinde önemli baskılanma meydana getirdiğini vurgulamışlardır ve kullanılan organizmanın organofosfatlı pestisitlere karşı oldukça hassas olduğunu bildirmişlerdir. Ferrari vd. (2004), azinfos metil, paratyon ve karbarilin belirli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *C. auratus*'ta CaE aktivitelerinde önemli azalma tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada CaE aktivitesinde karbarilin yaklaşık %86'lık oranda inhibisyona neden olduğu vurgulanmış, oluşan inhibisyon etkisinin ortadan kalkması için 35 günlük geri dönüşüm süresine ihtiyaç duyulacağı ifade edilmiştir. *O. mykiss* azinfos metil ve karbarilin belirli konsantrasyonlarına maruz kaldığında CaE aktivitesinde çok fazla baskılanma oluştuğunun vurgulandığı diğer bir çalışmada inhibisyon etkisinin CaE geri dönüşümünü sağlamadığı ifade edilmiştir (Ferrari vd., 2007). Her iki çalışmada da pestisitlerin organizmayı ölüm sürecine götürdüğü ve enzim baskılanmasının çok fazla olabileceği vurgulanmıştır (Ferrari vd., 2004 ve 2007). Varo vd. (2008), yaptıkları çalışmada organofosfatlı pestisit olan diklorvosa maruz kalan *A. iberus* bireylerinde CaE aktivitesini ölçmüş ve belirli düzeylerde inhibisyon tespit etmişlerdir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda uyguladığımız pestisit ve oluşturduğu etkinin diğer çalışmalarla oldukça benzer olduğu görülmektedir. OP'li pestisitlere maruz kalma sonucunda görülen CaE aktivitesindeki azalma ve geri dönüşümün yavaş olması bu enzimin OP pestisitlere karşı çok hassas olduğuna ve enzim sentez mekanizmasında önemli bozulmalara yol açtığına yorumlanabilir.



Şekil 5.3. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında CaE enzim aktivitesi



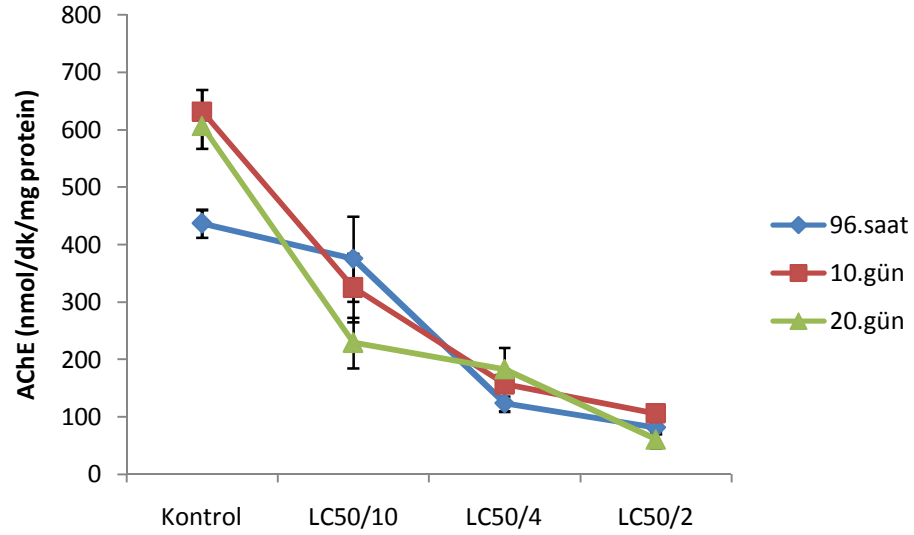
Şekil 5.4. 96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında CaE enzim aktivitesi

SPR'nin farklı konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan *D. rerio*'da AChE enzim aktivitesinde önemli düzeylerde inhibisyon tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Pestisit uygulamasından sonraki 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri boyunca da inhibisyon etkisinin ortadan kalkmaması literatürdeki diğer çalışmalarla da benzerlik göstermektedir (Şekil 5.5). Hernandez vd. (2010), *T. tinca* balıklarının 60 gün boyunca deltametrin ve karbofuran pestisitlerine maruz bırakmış, uygulama sonucunda AChE aktivitesi önemli ölçüde azalmış ve 30 günlük geri dönüşüm süresi sonunda enzim aktivitesinin ancak bazal seviyeye geri döndüğünü ve pestisitlerin organizma üzerinde ölümcül etkiler ortaya çıkardığını ifade etmişlerdir. Üner vd.

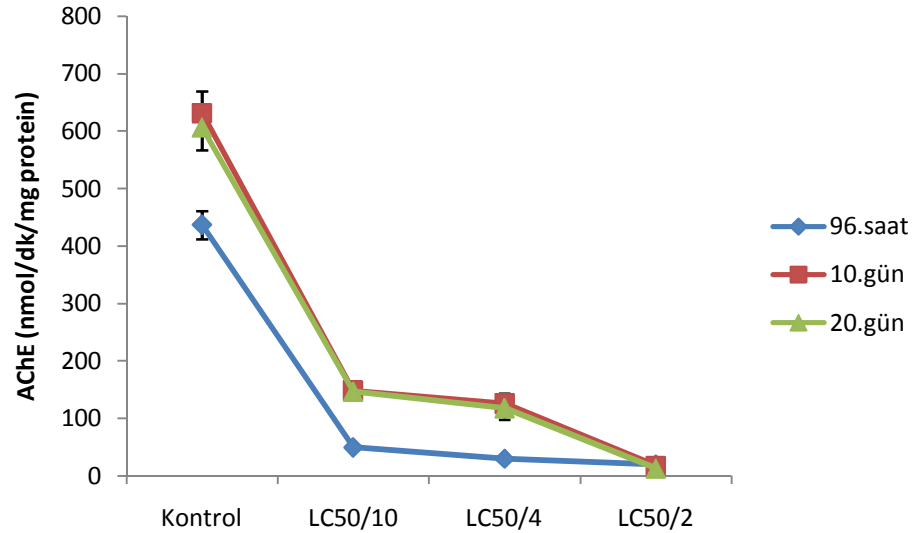
(2006), diazinona maruz bırakılan *O. niloticus*'ta 1, 7, 15, 30 günlük uygulama periyotları sonucunda AChE aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını ifade etmişler ve bunun da P450 inhibisyonuna yol açmasından kaynaklanabileceğini vurgulamışlardır. Vanessa vd. (2012), endsülfana maruz kalan zebra balıklarında AChE aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını, bu azalışın yaklaşık %40 seviyelerinde olduğunu ve endsülfanın sinir sistemi üzerinde yıkıcı etkilerinin olabildiğini ifade etmişlerdir.

Fosalon uygulamasından sonra AChE aktivitesi, uygulanan tüm konsantrasyonlarda ve uygulama sürelerinde önemli miktarlarda inhibe olmuştur (Şekil 5.6). Tüm baskılanmalar istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemlidir ($p < 0.001$). Erwin vd. (2003), organofosfat grubuna dahil olan paratyonu 250 gün boyunca *D. rerio*'ya maruz bırakmış ve neticede AChE aktivitesinde belirgin düzeylerde baskılanma tespit etmişlerdir, baskılanmanın sebebi olarak da pestisit AChE sentez yolunu bozması olabileceğini iddia etmişlerdir. Juliana vd. (2013), *D. rerio*, *P. perna*, *J. multidentata*'nın test organizması olarak kullanıldığı bir çalışmada organofosfatlı pestisit olan glifosat uygulamasından sonra kullanılan test organizmalarının çeşitli dokularında AChE aktivitesi ölçmüşlerdir. Buna göre kullanılan tüm türlerde enzim inhibisyonu tespit edilmiş, bu pestisite *P. perna*'nın diğer iki organizmaya göre daha hassas olduğu, pestisit enzim sentezleyen genler üzerinde olumsuz etkide bulunabileceğini ifade etmişlerdir. Feng vd. (2008), triklorfona maruz kalma sonrası *T. nilotica*'da AChE enziminin önemli ölçüde inhibe olduğunu vurgulamıştır. Diazinona maruz kalma sonrası *D. rerio*'nun AChE aktivitesinde baskılanmalar tespit edilmiştir bu baskılanmanın sebebi olarak okson metabolitlerinin ortadan kaldırılması için AChE inhibisyonunun ölümcül seviyede olduğunu ifade etmişlerdir (Johannes vd., 1995). Melpomeni vd. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada, *S. aurata*'ya azinfos metil, paratyon metil, klorpirifos metil, metamidofos ve diazinon gibi beş farklı organofosfatlı pestisit uygulanmış ve bu pestisitlerin canlıların kalbindeki AChE üzerine etkisini test etmişlerdir. Buna göre; azinfosmetil ve metamidofos kalp kulakçıklarında kolinerjik etkiyi arttırmış, atropin uygulamasıyla bu etkide %140 oranında geri dönüşüm sağlandığı ifade edilmiştir. Azinfosmetilin bu kimyasallar içerisinde en fazla antikolinesteraza etki eden bileşik olduğu vurgulanmıştır. Literatürdeki bu çalışmaların ortak noktası OP'li bileşiklere maruz kalma sonrası AChE inhibisyonunun çok yüksek düzeyde gerçekleşmesidir. Organofosfatlı pestisitlerin

genel olarak CaE ve AChE inhibisyonuna neden olduğu yaptığımız çalışma ile de desteklenmektedir. AChE inhibisyonu sonucunda kolinerjik sinapslarda asetil kolinin birikmeye başlaması, bunun sonucunda da nikotinik ve muskarinik reseptörlerde çok yüksek seviyede uyarılmasıyla yorumlanabilir.



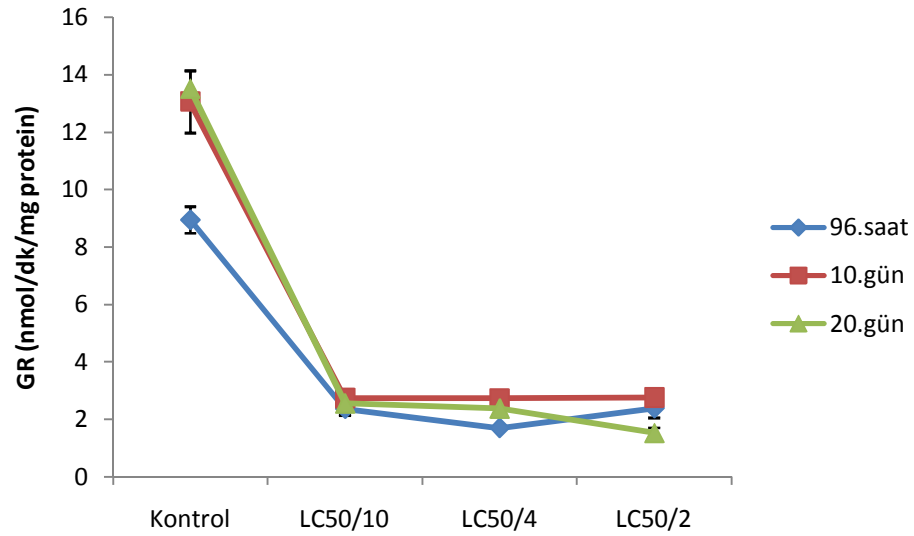
Şekil 5.5.96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi



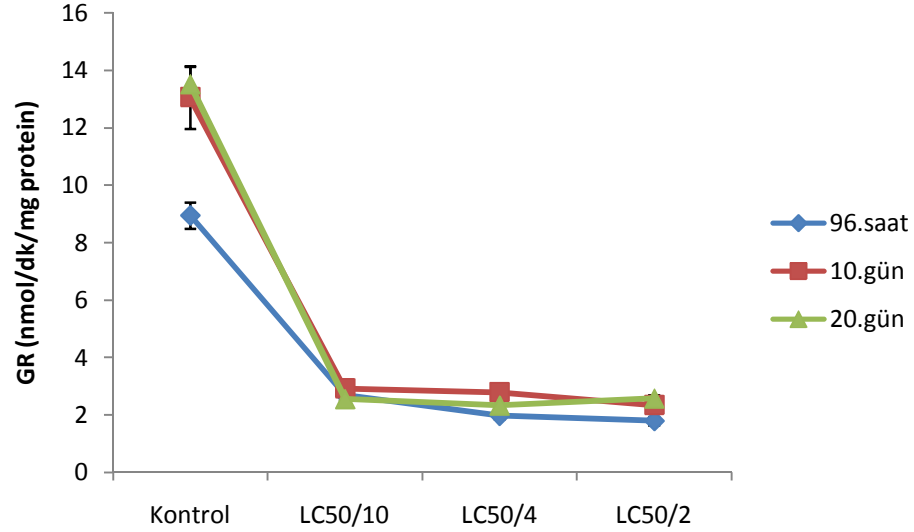
Şekil 5.6.96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi

GR aktivitesi, SPR'nin tüm konsantrasyonlarında ve tüm uygulama süreleri sonunda önemli miktarlarda inhibisyona uğramıştır (Şekil 5.7).

Yaptığımız çalışmada GR aktivitesinde FSL'nin tüm konsantrasyonları ve uygulama süreleri sonunda azalmalar meydana gelmiştir (Şekil 5.8). Archana vd. (2011), metil paratyon ve klorpirifosun her ikisinin de *P. reticulata*'da beyin dokusunda GR aktivitesinde inhibisyonlara neden olduğunu, bu pestisitlerin ROS üreterek ve oksidatif strese neden olarak hücresel hasarı arttırdığı ve böylece GR aktivitesinde baskılanmaya neden olduğunu vurgulamışlardır. Kavitha vd. (2009), profenofosun subletal konsantrasyonlarının *O. mossambicus*'ta solungaçlarda GR aktivitesini inhibe ettiğini ifade etmişlerdir ve geri dönüşüm periyotlarında bu enzimin aktivitesinde artış ve azalışlar olduğunu, düşük GSH seviyesinin GR aktivitesinin de baskılanmasına sebep olduğunu, dolayısıyla ortaya çıkan oksidatif dengesizlik nedeniyle hücre ölümüne yol açtığını bildirmişlerdir. GR aktivitesinin baskılanması pestisitlerin enzimi baskılayarak toksik hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 5.7. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi

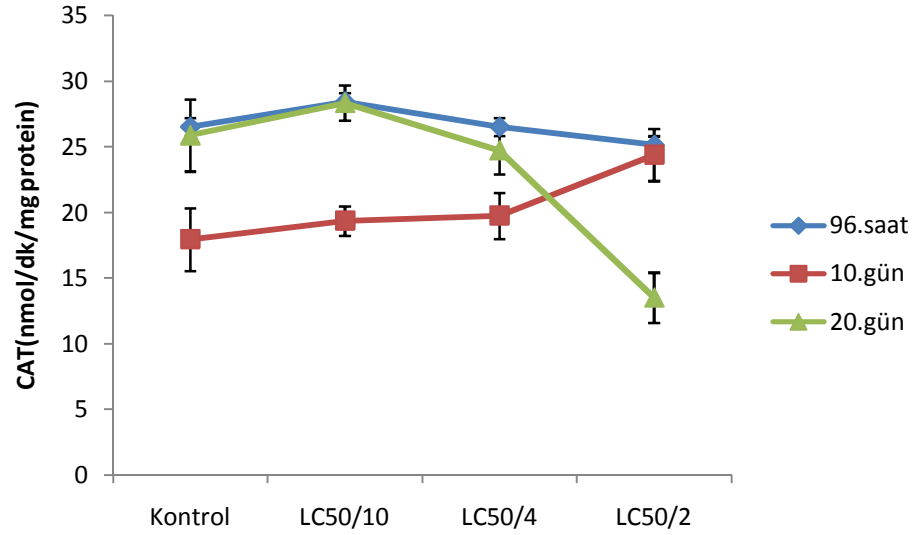


Şekil 5.8.96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi

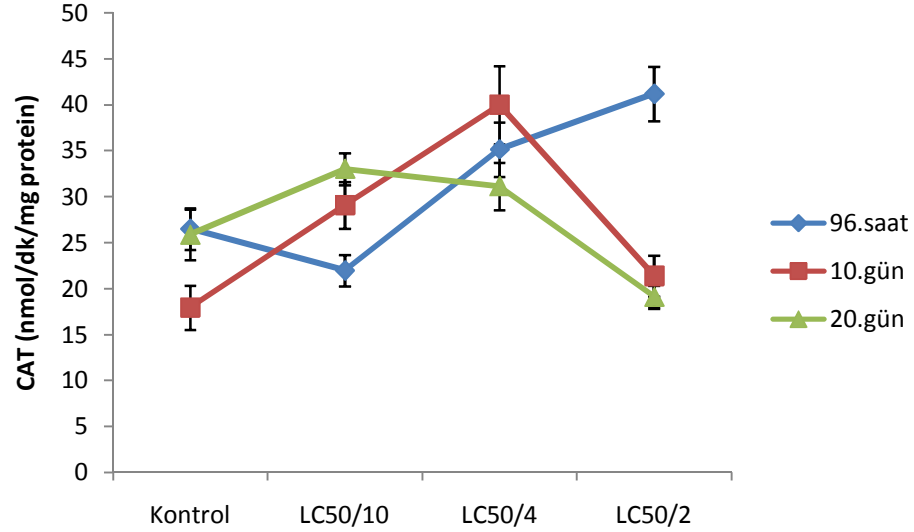
SPR'nin tüm konsantrasyonları ve tüm uygulama süreleri CAT aktivitesine önemli düzeylerde değişimlere neden olmuştur (Şekil 5.9). Yang vd. (2014), sipermetrin ve permetrinin zebrabalıkları üzerinde etkilerini incelemiş, iki pestisit ayrı ayrı uygulandığında CAT enzimi üzerinde istatistiksel anlamda fark gözlenmemiş fakat karışım durumunda CAT enziminin induklendiğini, pestisitlerin subletal konsantrasyonlarının bile oluşturduğu oksidatif stres ile gen ifadesinin etkilenebileceğini ifade etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada da bu çalışmaya çok benzer sonuçlar elde edilmiştir. Xiangguo vd. (2011), zebrabalıklarının embriyonal dönemde sipermetrinin 96 saatlik uygulamaları sonucunda CAT indüksiyonu gerçekleştiğini, sipermetrine maruz kalmayla gelişen toksisitenin CAT regülasyonun sağlayan gen ifadesine ve DNA tamir kapasitesine etki edebileceğini vurgulamışlardır.

CAT aktivitesi FSL'nin farklı konsantrasyonlarında ve farklı uygulama süreleri sonunda değişkenlik göstermiştir (Şekil 5.10). 96 saatlik FSL $LC_{50/2}$ konsantrasyonu uygulaması CAT aktivitesinde artışa yol açarken, geri dönüşüm süreleri sonunda artış veya azalışlar sonrasında geri dönüşler gerçekleşmiştir. Feng vd. (2008), yaptığı bir çalışmada organofosforlu pestisit olan triklorfon uygulamasından sonra *T. nilotica*'da CAT enziminde inhibisyonlar tespit etmişlerdir bu baskılanmanın da pestisitin çok yüksek miktarda ROS üretimine sebep olmasıyla açıklanabileceğini ifade etmişlerdir. Oruç (2010), klorpirifosa maruz kalan *O. niloticus*'ta CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak fark gözlemleyememiştir. Lindalva vd. (2008),

diiflubenzurona maruz kalan *P. lineatus*'ta CAT aktivitesinde indüksiyonlar olduğunu buna da ortaya çıkan ROS bileşiklerinin sebep olabileceğini ifade etmişleridir. Diana vd. (2009), metil paratyona maruz kalan *B. cephalus*'ta CAT aktivitesinde artışlar tespit etmiştir ve indüksiyon sebebi olarak ROS üretimine dikkat çekmişlerdir. Kavitha vd. (2014), profenofosun subletal konsantrasyonlarının *O. mossambicus*'ta CAT'ın solungaç ve iç organlarda inhibe olduğunu ifade etmiştir. Ferrari vd. (2011), azinfos metil uygulaması sonrasında *R. arenarum*'da CAT aktivitesinin azaldığını vurgulamışlardır. FSL uygulaması sonucu meydana gelebilecek reaktif oksijen türlerindeki (ROS) üretim artışının CAT aktivitesi indüklenmesi ya da aktif merkezindeki hem grubuna ROS türlerinin doğrudan bağlanması sonucu CAT aktivitesinin inhibisyona uğraması şeklinde yorumlanabilir (Ferrari vd., 2009).



Şekil 5.9.96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi

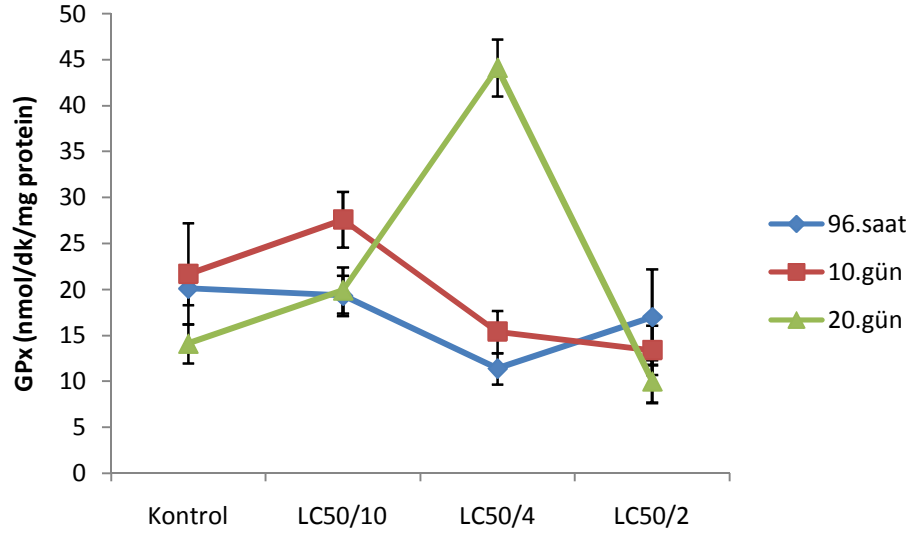


Şekil 5.10.96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi

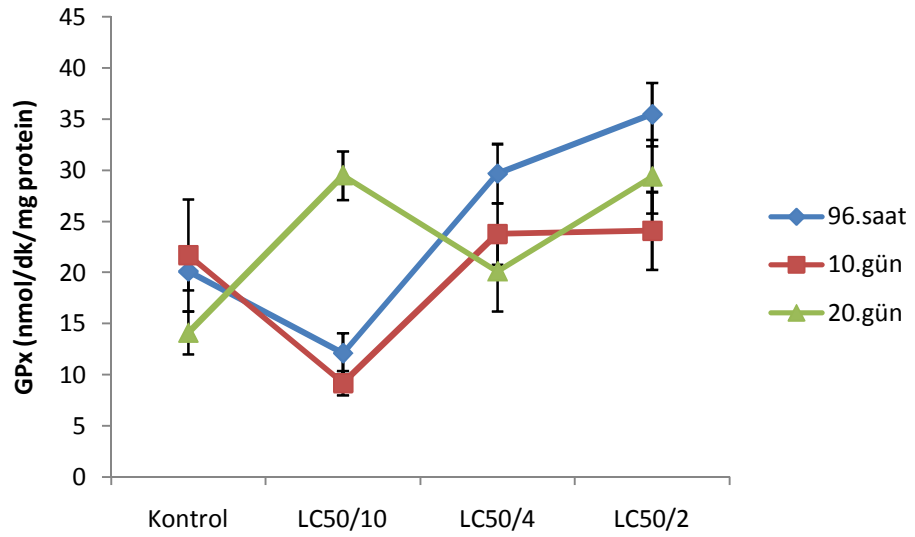
Yaptığımız çalışmada farklı SPR konsantrasyonları ve uygulama sürelerinde GPx aktivitesinde çeşitli değişimler gözlenmiştir (Şekil 5.11). 96 saat ve 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda aktivite genel anlamıyla azalırken 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda artış ve azalışlar gerçekleşmiş ve belirli düzeylerde geri dönüşüm sağlanmıştır. Oruç (2010), yaptığı çalışmada klorpirifosa maruz bırakılan *O. niloticus*'ta da bizim çalışmamıza benzer olarak GPx ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli farklar tespit edememiştir. Antioksidan enzimler okside bileşiklere karşı savunma görevi görürler ve oluşan yeni yaşam koşullarının organizmanın adapte olmalarını sağlarlar. GPx ve GST'nin lipid peroksidasyonuna karşı beraber görev aldığı bilinmektedir. GPx esas antioksidan enzimdir çünkü H_2O_2 'ye karşı affinitesi CAT'a göre daha yüksektir. Bu bilgiler ışığında GPx aktivitesinde görülecek olan artışın balıkların oksidatif strese vermiş olduğu yanıt olacağı düşünülebilir. Fakat çalışmamızda tespit edilen GPx inhibisyonları enzim sentez mekanizmasında pestisite bağlı bozulmaların oluşabileceğini de düşündürmektedir.

GPx aktivitesi, genel olarak 96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında artış göstermiştir. ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 5.12). GPx çevre kirlenmesinin canlılarda ortaya çıkardığı oksidatif hasarın belirlenmesinde biyokimyasal parametre olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Oruç (2010), klorpirifosa maruz kalan *O. niloticus*'ta GPx aktivitesinde artışlar tespit etmiştir. Metil paratyonun *B. cephalus*'a uygulanmasından sonra GPx aktivitesinde ve GSH seviyesinde azalma gösterdiği

ifade edilmiştir. Çalışmamızda GPx aktivitesindeki artış, serbest radikal üretiminin, detoksifikasyon kapasitesinin üzerinde olması ile yorumlanabilir.



Şekil 5.11.96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi

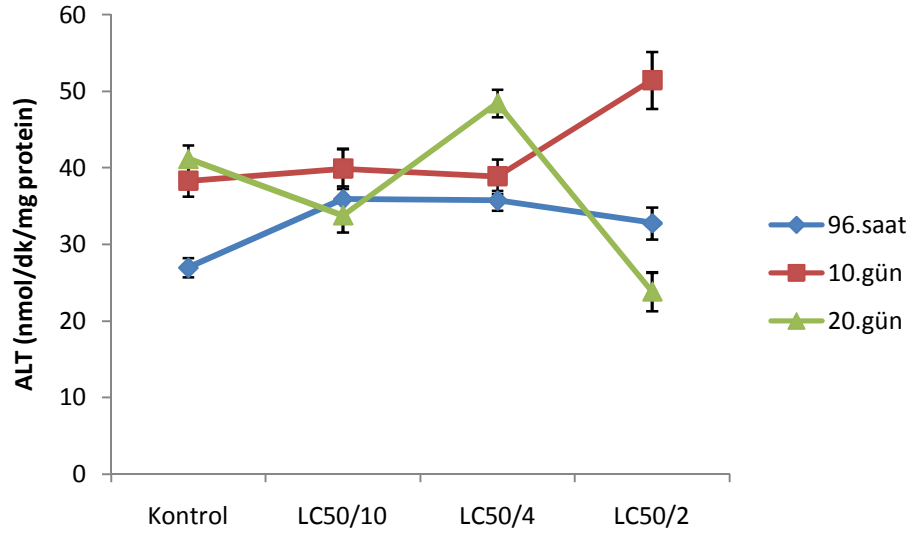


Şekil 5.12.96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi

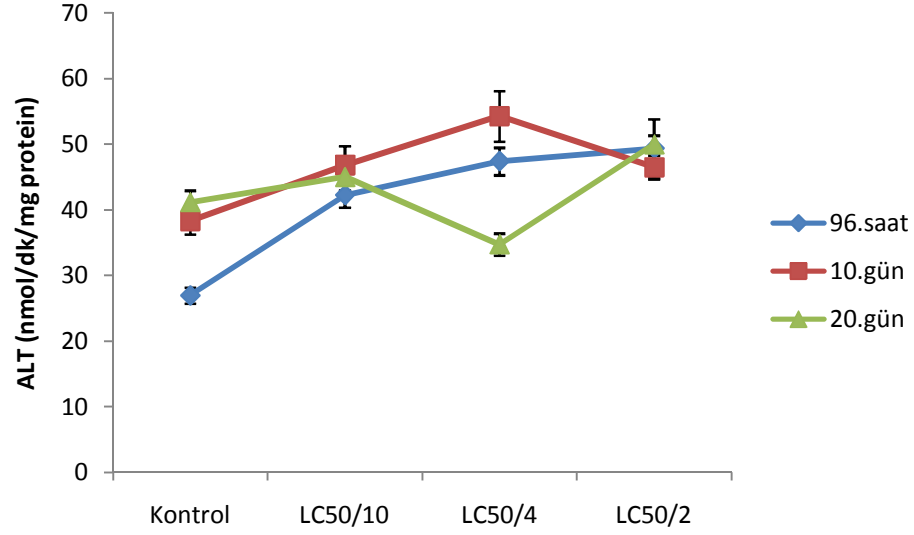
D. rerio bireylerinde SPR' ye maruz kalma sonucunda, ALT enzim aktivitesinde 96 saatlik uygulamada istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında çeşitli düzeylerde artışlar gözlenmiştir (Şekil 5.13). 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda artışlar olmuş fakat istatistiksel olarak herhangi bir

düzeyde fark tespit edilmemiştir. 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ise çeşitli düzeylerde aktivite ölçülmüş ve geri dönüşümler tespit edilmiştir.

Araştırma sonuçlarımıza göre, 96 saat fosalone maruz bırakılan ve sonrasında 10-20 gün geri dönüşüm süresi uygulanan balıklarda ALT enzim aktivitesinde 96 saatlik uygulamada istatistiksel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli düzeyinde artışlar gözlenmiştir (Şekil 5.14) ($p<0.001$). Geri dönüşüm süreleri sonunda enzim aktivitelerinde iyileşmeler tespit edilmiştir.



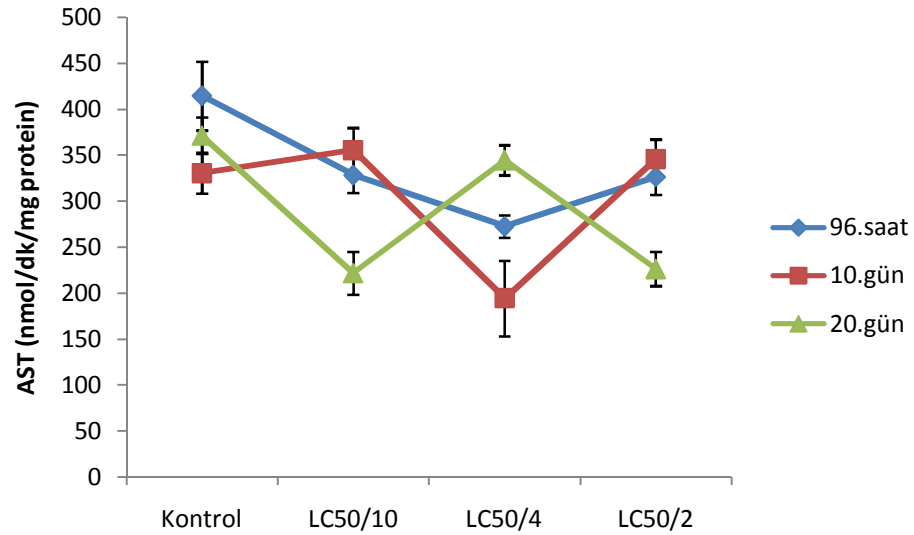
Şekil 5.13. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi



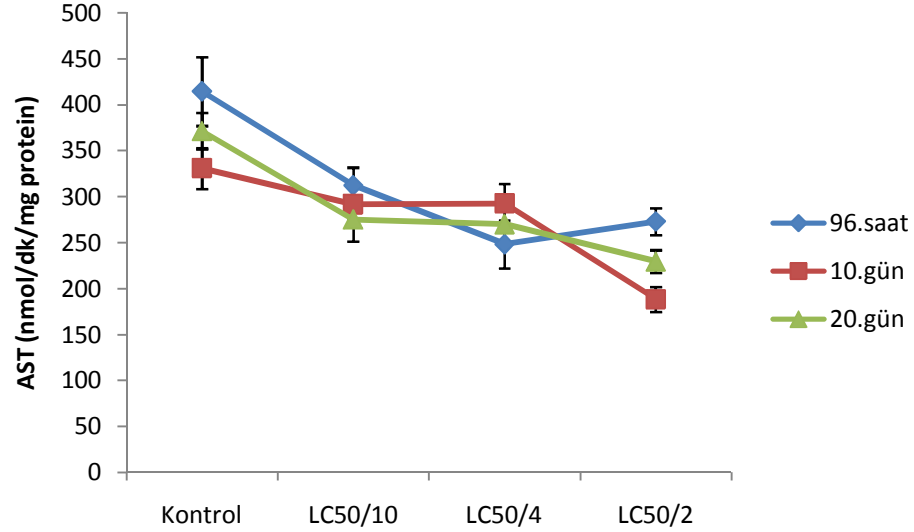
Şekil 5.14. 96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi

SPR uygulamasıyla AST enzim aktivitesinde 96 saat sonunda azalış gözlenmiştir ($p<0.001$ ve $p<0.05$). Enzim aktivitesinde geri dönüşüm süreleri sonunda iyileşmeler tespit edilmiştir (Şekil 5.15).

FSL uygulamasıyla AST enzim aktivitesinde 96 saat sonunda azalış gözlenmiştir ($p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$) (Şekil 5.16). Geri dönüşüm süreleri sonunda iyileşmeler gerçekleşmiştir.



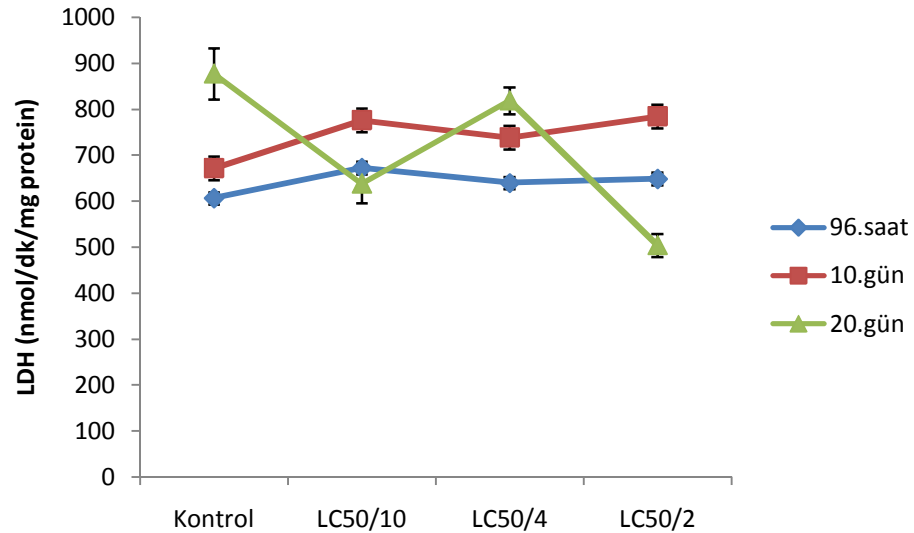
Şekil 5.15. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi



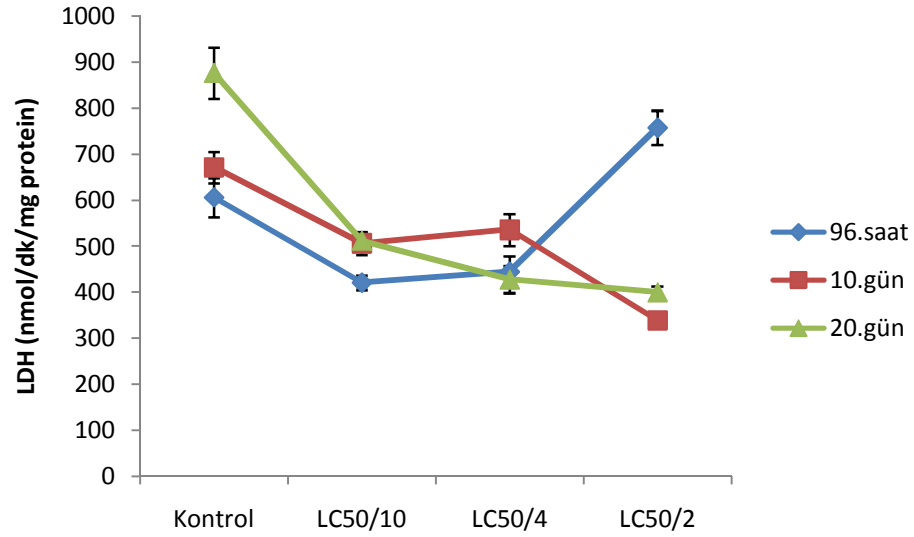
Şekil 5.16. 96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi

SPR uygulamasıyla LDH aktivitesi genel anlamda artış göstermiştir, fakat 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda bazı konsantrasyonlarda azalışlar görülmüştür (Şekil 5.17).

FSL uygulamasıyla LDH aktivitesi $LC_{50/2}$ konsantrasyonunun 96 saat uygulamasında artmış fakat diğer konsantrasyonlar ve tüm uygulama süreleri boyunca azalmıştır (Şekil 5.18). LDH aktivitesinde artış gözlenmesi, FSL'nin metabolizmada bozulmalara yol açması şeklinde düşünülebilir.



Şekil 5.17. 96 saatlik SPR uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi



Şekil 5.18.96 saatlik FSL uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi

Encarna vd. (2009), yaptığı çalışmada trisiklazolün *D. rerio*'da oluşturduğu etkileri incelediğinde tüm vücut homojenatında ALT ve LDH aktivitesinin yükseldiğini, AST aktivitesinin azaldığını vurgulamıştır. Araştırmacılar, trisiklazolün hepatositlere ve pek çok dokuya hasar verdiğini, buna bağlı olarak transaminaz aktivitesine etkiye bulunduğunu ifade etmişlerdir. LDH aktivitesinin yükselmesini anaerobik glikoliz için daha fazla enerji gereksinimine ihtiyaç olabileceğini ifade etmişlerdir.

Ghousia (2005), yaptığı çalışmada, sipermetrine maruz kalan *C. batrachus* üzerine etkisini araştırmış, çeşitli dokularda ALT ve AST aktivitesinin yükseldiğini geri dönüşüm süresi boyunca da aktivitenin kontrol grubuna yaklaştığını belirtmiştir. Plazmada transaminazların aktivitesindeki artışın organizmadaki hepatoselüler hasara ve protein katabolizmasının artışıyla yorumlamıştır.

Sancho vd. (2010), bir fungusit olan tebukonazol uygulaması sonrası *D. rerio*'da gerçekleşen değişimleri incelediğinde, AST aktivitesinin önemli miktarlarda azaldığını, LDH aktivitesinin ise yükseldiğini vurgulamıştır. Maruz kalma sonrası 7-14 gün geri dönüşüm süresi uygulanmış fakat bu enzimlerin normal aktivite değerlerine gelebilmesi için daha fazla süreye ihtiyaç duyulabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada yüksek transaminaz aktivitesinin (ALT), SPR'nin zebra balıklarında patolojik değişimleri indüklemesinin neticesinde ortaya çıktığı düşünülebilir. Yaptığımız çalışmada 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda elde ettiğimiz

bazı verilerin kontrol grubundan uzak oluşu benzer olarak daha fazla geri dönüşüm süresi gerekebileceği açısından benzerdir.

Güngördü vd. (2013), benzimidazole grubu içeren organofosfat kökenli maddelere maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında çalışmamıza benzer olarak ALT indüksiyonu ve LDH inhibisyonu tespit etmişlerdir. AST inhibisyonunu ise bazı konsantrasyonlarda tespit ettiklerini vurgulamışlardır. Bu sonuçlar ile bulgularımızın benzerliği pestisite maruz kalma sonucu kas dokularındaki bir hasara yol açtığına da akla getirmektedir.

Encarna vd. (2009), yaptığı çalışmada trisiklazolün *D. rerio*'da oluşturduğu etkileri incelediğinde ALT ve LDH aktivitesinin yükseldiğini, AST aktivitesinin azaldığını vurgulamıştır. AST ve ALT, hepatoksisitenin tanımlanmasında kullanılabilecek duyarlı belirteçler arasındadır. Çalışmamızda yüksek tranaminaz aktivitesinin (ALT), balıklarda patolojik değişimleri indüklenmesinin bir sonucu olduğu düşünülebilir.

Çalışmamızda, SPR ve FSL karışımlarının biyokimyasal belirteçler üzerindeki etkileri de 96 saat uygulama sonrasında 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri ele alınarak incelenmiştir.

Yaptığımız çalışmada SPR ve FSL'nin ikili kombinasyonlarında, 96 saat süreyle SPR LC_{50/2}-FSL LC_{50/2} karışımına maruz kalan *D. rerio* bireylerinin tümünün öldüğü görülmüştür. Bu da pestisitlerin LC_{50/2} karışımının öldürücü etki düzeylerinin, tek başlarına pestisitlerin belirtilen konsantrasyonlarının öldürücü etki düzeylerinden daha yüksek olduğunun bir göstergesidir.

Ksenobiyotiklerin toksik etkilerinin araştırıldığı pek çok çalışmada kimyasalların yalnız başına kullanıldıklarında ne tür etkilere yol açacağı incelenmiştir. Oysa ksenobiyotiklerle kirlenen ekosistemlerde bir kimyasal madde yerine çok çeşitli sayı ve yapıda toksik maddeler bir arada bulunabilir. Doğada bir karışım halinde bulunduklarında, bu kimyasallar toksik yanıtı artıran ya da azaltan/durduran etkiler yaratabilirler. Kimyasal etkileşim, kinetik fazda canlının toksik maddeyi alınımını, dağılımını, depolanmasını ve metabolizmasını değiştirerek veya dinamik fazda, toksik madde-reseptör bağlanma aktivitesi ve çekimini değiştirerek fiziksel ya da kimyasal olabilmektedir.

SPR+FSL karışımı uygulaması ile seçilen biyobelirteçlerden GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri arasındaki ilişkiye bakıldığında, GST aktivitesinde 96 saatlik uygulamalarda önemli artışlar ($p<0.001$) (Şekil 5.19), CaE ve AChE

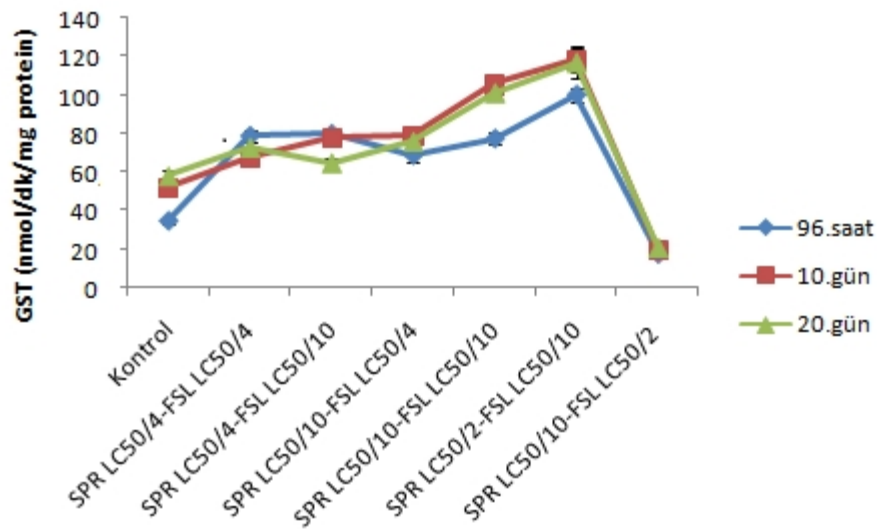
aktivitesinde ise önemli azalışlar tespit edilmiştir ($p<0.001$) (Şekil 5.20., 21). Tek başına 96 saatlik uygulamada SPR, GST aktivitesinde en yüksek %83.5 artışa tek başına FSL uygulamasında ise GST aktivitesinde en yüksek %96 oranında artışa, tek başına SPR, CaE aktivitesinde en düşük %76 azalışa tek başına FSL CaE aktivitesinde en düşük %84 oranında azalışa, tek başına SPR AChE aktivitesinde en düşük %81 azalışa tek başına FSL AChE aktivitesinde en düşük %95 oranında azalışa neden olmuştur. 96 saatlik SPR+FSL uygulamasında GST aktivitesinde en yüksek %188 oranında artış (additif etki), CaE aktivitesinde en düşük %83 oranında azalış (sinerjistik etki), AChE aktivitesinde en düşük %95 oranında azalış (sinerjistik etki) tespit edilmiştir.

10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, GST aktivitesinde en yüksek %40 oranında artışa tek başına FSL, GST aktivitesinde en yüksek %57 oranında artışa, tek başına SPR CaE aktivitesinde en düşük %65 oranında azalışa tek başına FSL CaE aktivitesinde en düşük % 86 oranında azalışa, tek başına SPR AChE aktivitesinde en düşük % 83 oranında azalışa tek başına FSL, AChE aktivitesinde en düşük %97 oranında azalışa neden olmuştur. SPR+FSL karışımı kombinasyonunun 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda GST aktivitesinde en yüksek %127 oranında artış (additif etki), CaE aktivitesinde en düşük %84 oranında azalış (additif etki), AChE aktivitesinde en düşük %94 oranında azalış (additif etki) tespit edilmiştir.

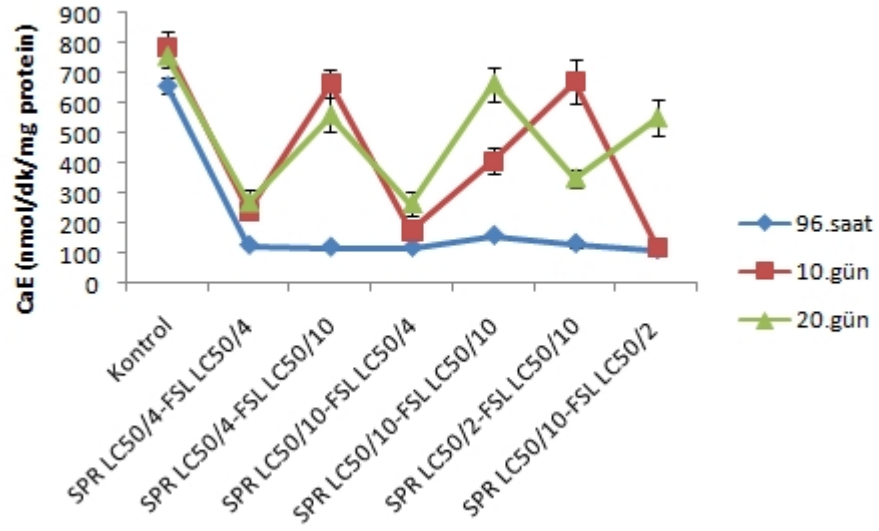
20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, GST aktivitesinde en yüksek %28 oranında artışa tek başına FSL, GST aktivitesinde en yüksek %24 oranında artışa, tek başına SPR en düşük CaE aktivitesinde %78 oranında azalışa tek başına FSL CaE aktivitesinde en düşük %86 oranında azalışa, tek başına SPR, AChE aktivitesinde en düşük %90 oranında azalışa tek başına FSL, AChE aktivitesinde en düşük %98 oranında azalışa neden olmuştur. 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda SPR+FSL karışım kombinasyonunda GST aktivitesinde en yüksek %102 oranında artış (additif etki), CaE aktivitesinde en düşük %65 oranında azalış (antagonist etki), AChE aktivitesinde en düşük %84 oranında azalış (antagonist etki) tespit edilmiştir.

GST ve AChE aktivitelerinin tek tek uygulamalardan daha fazla etkilenmelerinin sebebi olarak, kimyasal maddelerin birlikte kullanıldıklarında birbirlerinin etkisini arttırma anlamına gelen sinerjistik ve additif etkileşimlerle açıklanabilir. Tek başına FSL uygulamasının AChE aktivitesinde karışımlarla yakın azalış oranlarına sahip olması karışımda FSL etkisinin daha baskın olabileceği şeklinde değerlendirilebilir. Achana vd. (2012), lepestes balıklarına klorpirifos ve

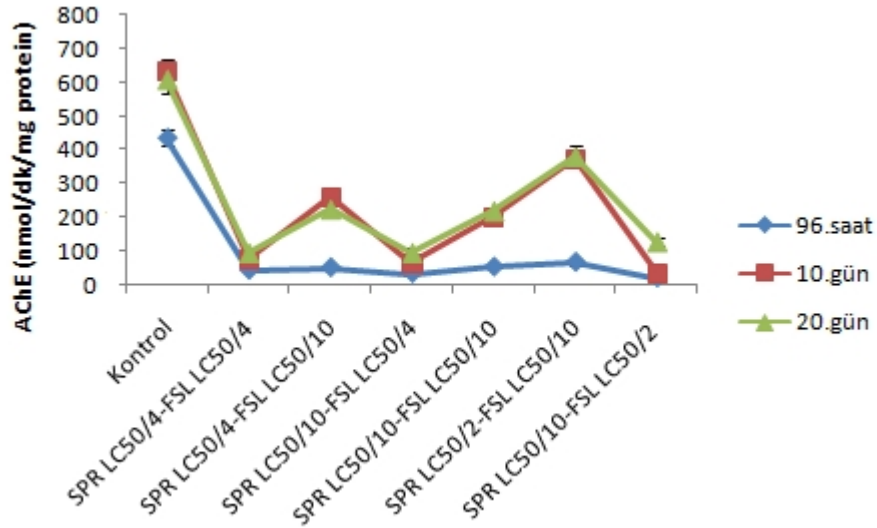
paratyon pestisitlerini uygulamış ve GST enziminin artış gösterdiğini ifade etmişlerdir. Feng vd. (2008), klorpirifos ve SDS karışımlarının belirli konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları *T. nilotica*'da GST inhibisyonunu gözlemlediklerini ifade etmişlerdir. Diflubenzurona maruz kalan *P. lineatus*'ta GST aktivitesinde indüksiyona sebep olduğu bir çalışmada vurgulanmıştır (Lindalva vd. 2008). Hernandez vd. (2010) deltametrin ve karbofuran uygulamasıyla *T. tinca*'da AChE aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını rapor etmişlerdir. Vanessa vd. (2012), endosülfana maruz kalan *D. rerio*'da AChE aktivitesinin yaklaşık %40 oranında baskılandığını ifade etmiştir. Feng vd. (2008), klorpirifos ve SDS karışımlarının belirli konsantrasyonlarına maruz bıraktıkları *T. nilotica*'da AChE inhibisyonun önemli dercelerde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Cathy vd. (2014), yaptıkları çalışmada malatyon ve eprotrop karışımının belirli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *O. kisutch*'ta sinerjistik etkiyle AChE ve CaE aktivitelerinde önemli miktarlarda baskılanma tespit etmiştir. Ferrari vd. (2004), azinfos metil, paratyon ve karbaril uygulanan *C. auratus*'ta CaE enzim aktivitelerinde belirgin azalışlar olduğunu vurgulamışlardır. Varo vd. (2008), diklorvosa maruz kalan *A. iberus*'ta CaE düzeylerinde inhibisyonların oluştuğunu vurgulamışlardır. CaE aktivitesinde pestisitlerin tek tek ve kombine halde uygulanması sonucunda tüm gruplarda inhibisyona uğramasının sebebi, zebrabalıklarının ölüm periyoduna girmeleri nedeniyle protein sentezinin baskılanmasının bir sonucu olarak meydana geldiği söylenebilir.



Şekil 5.19. 96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GST enzim aktivitesi



Şekil 5.20. 96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında CaE enzim aktivitesi



Şekil 5.21. 96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında AChE enzim aktivitesi

Zebrabalıklarında SPR ve FSL karışımı uygulamasına bağlı olarak GR, CAT ve GPx aktivitelerinde 96 saat uygulama, 10 ve 20 günlük geri dönüşüm süreleri sonunda çeşitli değişimler olmuştur. 96 saat sonunda tek başına SPR, GR aktivitesinde en düşük %81 oranında azalışa tek başına FSL uygulamasında GR aktivitesinde en düşük %80 oranında azalışa, CAT aktivitesinde tek başına SPR en yüksek %7 oranında artışa, tek başına FSL CAT aktivitesinde en yüksek %55 oranında artışa, GPx aktivitesinde tek başına SPR en düşük %43 oranında azalışa

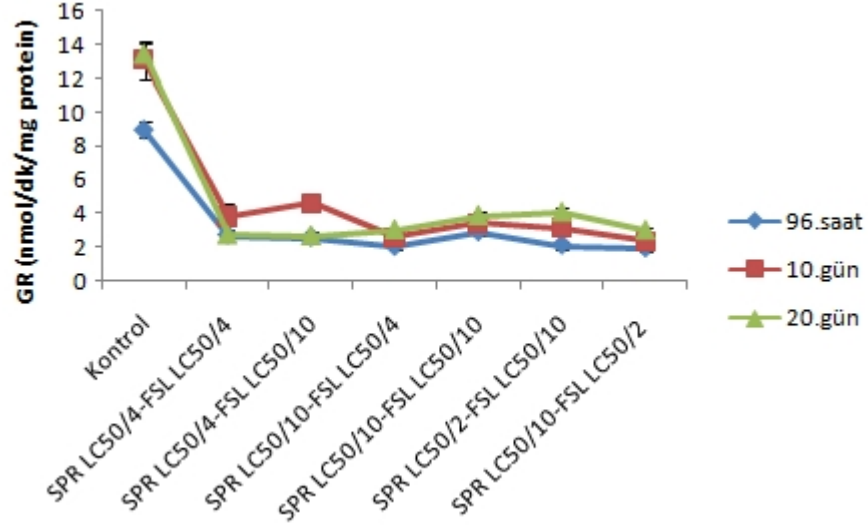
neden olmuştur. Tek başına FSL GPx aktivitesinde en yüksek %77 oranında artışa neden olmuştur. 96 saat sonunda SPR+FSL karışımında GR aktivitesinde en düşük %78 oranında azalış (Şekil 5.22). CAT aktivitesinde en yüksek %118 oranında artış (additif etki) (Şekil 5.23). GPx aktivitesinde en yüksek %47 oranında artış (antagonist etki) saptanmıştır (Şekil 5.24).

10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, GR aktivitesinde en düşük %79 oranında azalışa tek başına FSL, GR aktivitesinde en düşük %82 oranında azalışa, CAT aktivitesinde tek başına SPR en yüksek %36 oranında artışa tek başına FSL CAT aktivitesinde en yüksek %123 oranında artışa, GPx aktivitesinde tek başına SPR en düşük %38 oranında azalışa neden olmuştur. FSL, tek başına GPx aktivitesinde en düşük %58 oranında azalışa neden olmuştur. 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda SPR+FSL karışımında GR aktivitesinde en düşük %82 oranında azalış (sinerjistik etki), CAT aktivitesinde en yüksek %188 oranında artış (additif etki), GPx aktivitesinde ise en düşük %49 oranında azalış gözlenmiştir.

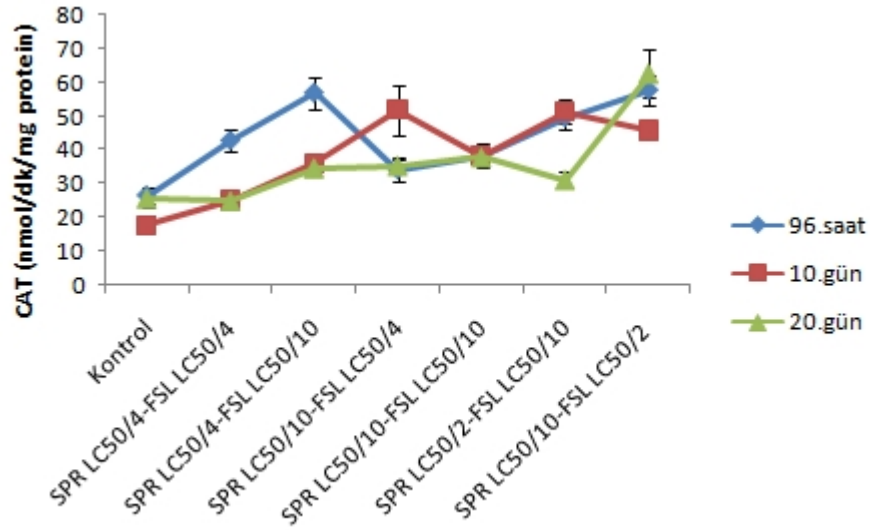
20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, GR aktivitesinde en düşük %89 oranında azalışa, tek başına FSL, GR aktivitesinde en düşük %54 oranında azalışa, CAT aktivitesinde tek başına SPR en düşük %48 oranında azalışa, CAT aktivitesinde tek başına FSL en yüksek %28 oranında artışa, GPx aktivitesinde tek başına SPR en yüksek %212 oranında artışa neden olmuştur. Tek başına FSL, GPx aktivitesinde en yüksek %109 oranında artışa neden olmuştur. 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda SPR+FSL karışımında GR aktivitesinde en düşük %80 oranında azalış (sinerjistik etki), CAT aktivitesinde en yüksek %142 oranında artış (additif etki), GPx aktivitesinde en yüksek %113 oranında artış tespit edilmiştir.

Ensibi vd. (2013), yaptıkları bir çalışmada deltametrine maruz kaldıktan sonra *C. carpio*'da CAT aktivitesinde artış olduğunu vurgulamışlardır. Archana vd. (2011), paratyon ve klorpirifos kombinasyonlarının lepidoptereslerde CAT ve GR enzim aktivitelerinin uygulanan doza bağlı olarak çeşitli değişimler gösterdiğini ifade etmişlerdir. Feng vd. (2008), triklorfon ve SDS karışımlarının belirli konsantrasyonlarının *T. nilotica*'da CAT aktivitesinde inhibisyonlar oluşturduğunu belirtmişlerdir. Diana vd. (2009), metil paratyon ve selenyum karışımının *B. cephalus*'da GPx aktivitesinde inhibisyonlar oluşturduğunu ifade etmişlerdir. GR aktivitesinin baskılanması kimyasalların enzimi baskılayarak serbest radikallerin birikimi nedeniyle toksik hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. CAT aktivitelerinde indüksiyon ve GPx aktivitelerinde inhibisyon görülmesinin sebebi

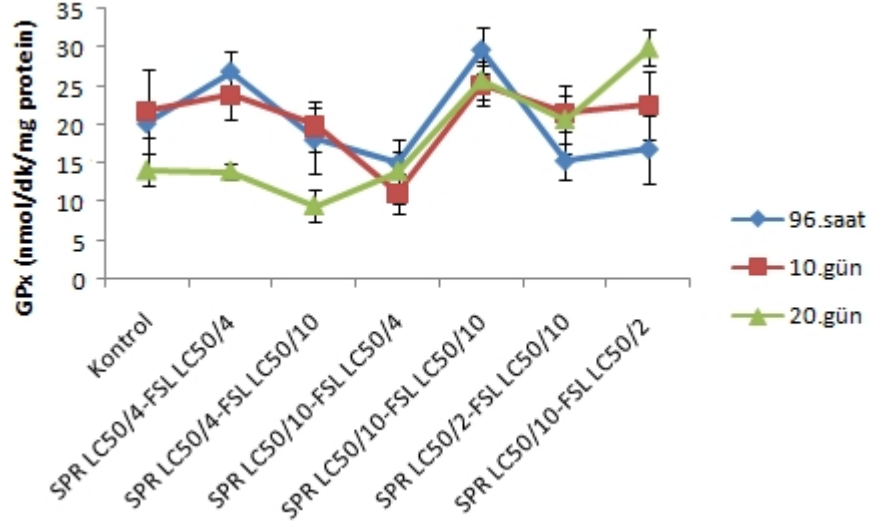
olarak, pestisitlere maruz kalınması sonucunda ilk yanıt olarak, diğer detoksifikasyon mekanizmalarından önce, serbest radikallerin etkisinden canlıyı korumak için antioksidan sistemlerin devreye girmesi şeklinde olabilir.



Şekil 5.22. 96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GR enzim aktivitesi



Şekil 5.23.96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında CAT enzim aktivitesi



Şekil 5.24.96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında GPx enzim aktivitesi

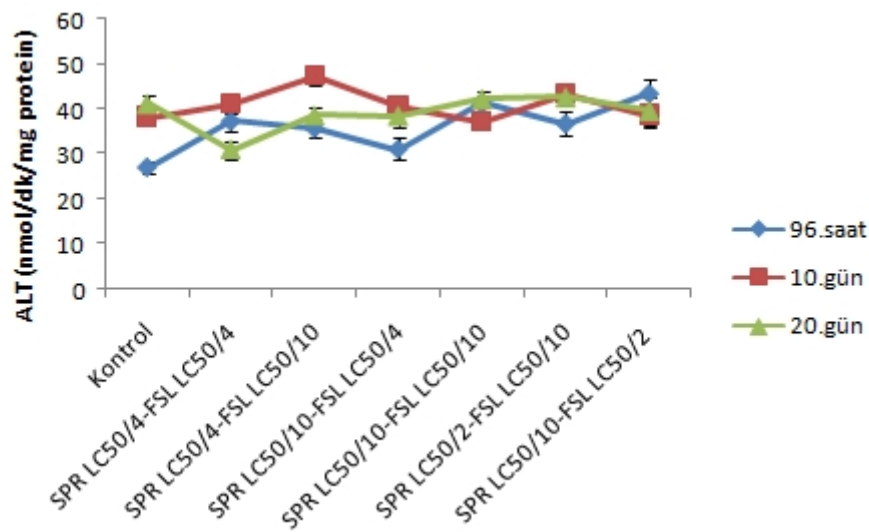
96 saat süreyle SPR+FSL karışımının uygulandığı bütün konsantrasyonlarda ALT (Şekil 5.25) ve LDH (Şekil 5.27) aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla önemli artışlar ($p<0.001$, $p<0.01$ ve $p<0.05$) AST aktivitesinde ise (Şekil 5.26) kontrol grubuna kıyasla önemli azalışlar tespit edilmiştir ($p<0.01$ ve $p<0.001$). Bu artış veya azalışlar SPR ve FSL'nin tek başlarına uygulandığı oranlardan daha fazla olabilmektedir. 96 saatlik uygulama sonucunda tek başına SPR, ALT aktivitesinde en yüksek %33 oranında artışa, tek başına FSL uygulamasında 96 saat sonunda en yüksek ALT aktivitesinde %83'lük artışa, tek başına SPR en düşük AST aktivitesinde %34'lük azalışa tek başına FSL, en düşük AST aktivitesinde %40'luk azalışa ve tek başına SPR, en yüksek LDH aktivitesinde %11'lik artışa tek başına FSL en düşük LDH aktivitesinde % 31 oranında azalışa neden olmuştur. 96 saatlik SPR+FSL kombinasyonunda ise ALT aktivitesinde en yüksek %61 (antagonist etki), AST aktivitesinde en düşük %67 (additif etki), LDH aktivitesinde en yüksek %23 (sinerjistik etki) oranlarında değişimler görülmüştür. Bu durum bilhassa aktivitede artışa neden olduğunda pestisitlerin tek başlarına oluşturdukları etkilere göre karışım halinde bulunduklarında daha toksik olduklarının bir göstergesi olarak düşünülebilir.

10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, ALT aktivitesinde en yüksek %34 oranında artışa tek başına FSL, ALT aktivitesinde en yüksek %42 oranında artışa, AST aktivitesinde tek başına SPR en düşük %41 oranında azalışa tek başına FSL AST aktivitesinde en düşük %43 oranında azalışa, LDH aktivitesinde tek başına SPR en yüksek %17 oranında artışa tek başına FSL, LDH aktivitesinde ise en

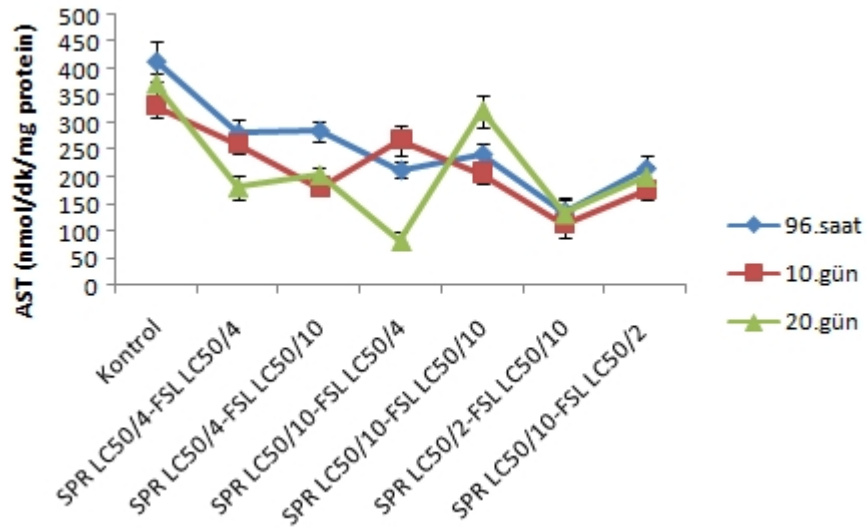
yüksek %49 oranında azalışa neden olmuştur. SPR+FSL kombinasyonunun 10 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ALT aktivitesinde en yüksek %19 oranında artış (antagonist etki), AST aktivitesinde en düşük %66 oranında azalış (sinerjistik etki), LDH en düşük %25 oranında azalış (sinerjistik etki) tespit edilmiştir.

20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda tek başına SPR, ALT aktivitesinde en düşük %42 oranında azalışa, tek başına FSL ALT aktivitesinde en yüksek %21 oranında artışa, tek başına SPR AST aktivitesinde en düşük %40 oranında azalışa, tek başına FSL,AST aktivitesinde en düşük %38 oranında azalışa ve tek başına SPR LDH aktivitesinde en düşük %42 oranında azalışa tek başına FSL, LDH aktivitesinde en düşük %54 oranında azalışa neden olmuştur. SPR+FSL kombinasyonunun 20 günlük geri dönüşüm süresi sonunda ALT aktivitesinde en düşük %25 oranında azalış (antagonist etki), AST aktivitesinde en düşük %78 oranında azalış (sinerjistik etki), LDH aktivitesinde en düşük %45 oranında azalış (sinerjistik etki) tespit edilmiştir.

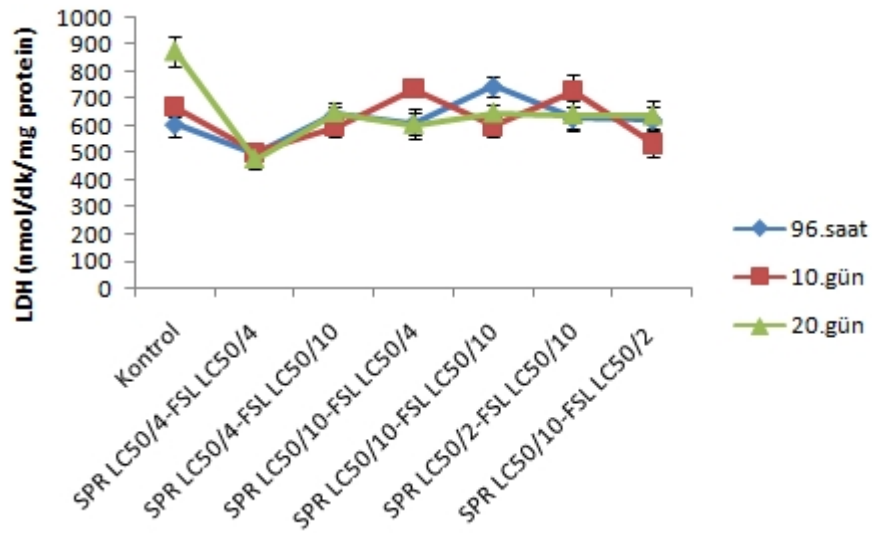
Aydın-Sinan vd. (2012), yaptıkları bir çalışmada deltametrin ve λ -siyalotrine maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında LDH aktivitelerinde azalma tespit etmişlerdir. ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerindeki bu değişimler tek başına FSL uygulamasının *D. rerio* bireylerinde duyarlılığı ve toksik etkiyi daha fazla arttırdığını ve karışımın metabolizmada hasara yol açarak bu enzim aktivitelerinde değişimlere neden olabileceğini söyleyebiliriz.



Şekil 5.25.96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında ALT enzim aktivitesi



Şekil 5.26.96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında AST enzim aktivitesi



Şekil 5.27.96 saatlik SPR+ FSL uygulaması ve sonrasında LDH enzim aktivitesi

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada SPR ve FSL'nin *D. rerio* için subletal konsantrasyonlarının, tek ve kombine kullanımlarının, ksenobiyotikler için biyobelirteç olan antioksidan enzimlerin (GR, CAT ve GPx), biyotransformasyon enzimi olan GST, esteraazlar (AChE, CaE) ve metabolik enzimler (AST, ALT, LDH) seviyelerinde istatistiksel olarak önemli değişimlere yol açtığı tespit edilmiştir. Kullanılan SPR ve FSL'nin *D. rerio* gibi hedef olmayan organizmalar için düşük dozlarda bile toksik olabileceği belirlenmiştir. Bundan yola çıkarak *D. rerio* bireylerinin pestisit toksisitesinin belirlenmesi için uygun bir biyoindikatör tür ve seçilen biyobelirteçlerin bu amaçla kullanışlı biyokimyasal parametreler olduğu söylenebilir. Çalışma verilerimiz, toksik maddeler doğal habitatları kirlettiğinden, bu kirleticilerin tek başlarına etkilerinden çok karışım halindeki etkilerin belirlenmesinin de önemli olduğu sonucunu doğurmaktadır. Ayrıca geri dönüşürlük çalışması ile bu pestisitlere subletal konsantrasyonlardamaruz kalmanın toksik etkilerinin geri dönüşürlüğünün olup olmadığı ve varsa hangi sürede oluşan toksik etkinin organizmada ortadan kalkabileceği önem taşımaktadır. Pestisit toksisitesi üzerine pek çok çalışma yapılmasına rağmen, pestisitlerin kombine etkileri ve geri dönüşürlük çalışmaları ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Ancak doğada pestisitler kimyasal bir karışım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle oluşan bu karışımların etkisinin araştırılması ve geri dönüşürlüğünün tespit edilebilmesi gerçek etkilerin ortaya konması bakımından bir gerekliliktir. Çalışmamızda GST, CaE, AChE ve GR gibi enzimlerin aktivitelerinde görülen değişimler kullanılan pestisitlerin subletal konsantrasyonlarının bile ne derece etkili olduğunu göstermektedir. Uyguladığımız geri dönüşüm süreleri yeterli olmamakla beraber eğer organizmalar doğal ortamlarda bu gibi pestisitlere ve karışımlarına maruz kalırlarsa daha fazla geri dönüşüm sürelerine ihtiyaç duyulabileceği düşünülmektedir. Pestisit kullanımındaki riskleri gösterebilmek ve bu konudaki bilinci arttırmak amacıyla bu ve benzeri çalışmaların daha fazla yapılması ve riskin daha detaylı çalışmalar ile ortaya konmasına gereksinim bulunmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- Aebi, H., (1974). Catalase. In: Bergmayer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London, 671–684.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H. S., Jain, S. K., Athar M. and Raisuddin S., (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1523** 37–48.
- Aihua, G., Xiangguo, S., Chen, Y., Guixiang, J., Yong, Z., Yan L., Ling S., Shoulin, W., Xinru, W., (2010). Exposure to fenvalerate causes brain impairment during zebrafish development, *Toxicol. Lett.* **197** 188–192.
- Akan, T., (2012). *Organofosforlu Pestisitlerin Arpa Bitkisi (Horedum vulgare L.) ve Zebra Balığı (Danio rerio) Üzerindeki in vitro Genotoksik Etkilerinin Comet Testi ile Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul.
- Aldridge, W. N., (1953). Serum esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination, *Biochem. J.*, **53** 110–117.
- Ali, H. A.J., Rani, V.J., (2009). Effect of phosalone on haematological indices in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **33** 407-411.
- Archana, A.S., Vimal, M., Priyanka, P., (2011). Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*, *Pestic. Biochem. Phys.* **101** 132–141.
- Armstrong, R. N., (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferase *Chem. Res. Toxicol.* **102**-18.
- Asztalos, B., Nemcsok, J., and Benedeczy, I., (1990). The effects of pesticides on some biochemical parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 275-282.
- Aydın-Sinan H., Güngördü, A. and Özmen, M., (2012). Toxic effects of deltamethrin and λ -cyhalothrin on *Xenopus laevis* tadpoles, *J. Environ. Sci. Heal. Part B* **47**, 397–402.
- Beauvais, L.S., Jones, S.B., Brewer, S.K. and Little, E.E, (2000). Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures, *Environ. Toxicol. Chem.* **19** 1875-1880.
- Beena, G., Partha, P. B., Fumio, K., Michio, I., and Indira, K. (2010). Priyadarsini, Role of Substrate Reactivity in the Glutathione Peroxidase (GPx) Activity of Selenocystine, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **83** (6), 703–708.
- Bell, J.G., Cowey, C.B., Adro, J.W., Shanks, A.M., (1985). Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Br. J. Nutr.* **53** 149-157.

- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P., (2001). Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **48** 140-147.
- Bhat, A., (2003). Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environ. Biol. Fishes* **68**, 25–38.
- Bradford, M.M., (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** 248–254.
- Brian E., Molecular & Developmental Biology (BIOL3530), Memorial University of Newfoundland, http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html
- Buttner, J.K., Soderberg, R.W., Terlizzi, D.E., (1993). An introduction to water chemistry in freshwater aquaculture. *Northeastern Regional Aquaculture Center Fact Sheet*, vol. 70.
- Camera, E. and Picardo, M., (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes, *J. Chromatogr. B, Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781** 181–206.
- Cathy, A.L., David H. B., Vincent, R.H., John D.S., Nathaniel, L.S., (2014). Elevated temperatures increase the toxicity of pesticide mixtures to juvenile coho salmon, *Aquat. Toxicol.* **146** 38– 44.
- Chemie, (2014). <http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/enzyme/ache.html>
- Cribb, A.E., Leeder, J.S., Spielberg, S.P., (1989). Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), *Anal. Biochem.* **183** 195-196.
- Çelik, E.S., Kaya, H., Yılmaz, S., (2012). Effects of Phosalone on Mineral Contents and Spinal Deformities in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.1758), *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.* **12** 259-264.
- Devaraj, P., Selvarajan, V.R., Durairaj, S., (1993). Respiratory Metabolism in Brain-Regions Of *Oreochromis mossambicus* During Phosalone Toxicity, *Zool. Jahrb., Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere.* **97** 135-140.
- Din (2002). Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- *Validierungsdokument* (38415- T6).
- Diwakar, M., Sunil, K.S., and Ajai, K.S., (2005). Effects of the insecticide cypermethrin on plasma calcium and ultimobranchial gland of a teleost, *Heteropneustes fossilis*, *Ecotox. Environ. Safe.* **60** 193–197.
- Ellman, G.L., Andres, D.C., (1961). New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* **7** 88–95.
- ELLS, (2014). European Learning Laboratory for the Life Sciences: http://emblog.embl.de/ells/ish2013/?page_id=126

- Encarna, S., Cristina, F., Ma, J.V., Enrique A.M., Ma Dolores, F., (2009). Physiological effects of tricyclazole on zebrafish (*Danio rerio*) and post-exposure recovery, *Comp. Biochem. Phys. Part C* **150** 25–32.
- Ensibi, C., Pérez-López, M., Soler R.F., Míguez-Santiyán M.P., Daly M.N. Yahya, Hernández-Moreno D., (2013). Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Environ. Toxicol. Phar.* **36** 384-391.
- EPA, (2014). <http://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:3:0:>
- Erwin, W.M.R., Rineke, K., Cornelis A.M. van G., (2003). Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion, *Aquat. Toxicol.* **64** 451-460.
- FAO. Food and Agriculture Organization. www.fao.org
- Feng, T., Li, Z.B., Guo, X.Q., Guo, J.P., (2008). Effects of trichlorfon and sodium dodecyl sulphate on antioxidant defense system and acetylcholinesterase of *Tilapia nilotica* in vitro, *Pestic. Biochem. Phys.* **92** 107–113.
- Ferrari, A., Andrés, V., Ana, M. P., (2007). Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Comp. Biochem. Phys. Part C* **146** 308–313.
- Ferrari, A., Andres, V., and Ana, M.P., (2004). Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*), *Ecotox. Environ. Safe.* **57** 420–425.
- Ferrari, A., Cecilia, L., Ana, M. P., Andrés, V., (2011). Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes, *Comp. Biochem. Phys. Part C* **153** 34–39.
- Finney, D.J., (1971). *Probit Analysis (3rd edition)*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fishman, M.C., (2001). Genomics Zebrafish the canonical vertebrate. *Science* **294**, 1290–1291.
- Forney, J.L., Reddy, A.C., Tien, M., Aust, T.S., (1982). The Involment of Hidroxy Radical Derived From Hydrogen Peroxide Lignin Deratation by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Biol. Chem.* **257**, 19 11455-11462.
- GATA, (2014). <http://www.gata.edu.tr/temelbilimler/biyokimya/seminer/OKS%C4%B0DAT%C4%B0F%20STRES.doc>
- Gerlach, G., (2006). Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement. *Anim. Behav.* **72**, 1119–1124.

- Ghousia, B., (2005). In vivo biochemical changes in liver and gill of *Clarias batrachus* during cypermethrin exposure and following cessation of exposure, *Pest. Biochem. Phys.* **82** 185–196.
- Güneş, G., (2010). *Sağlıklı Bireylerde Alanin Aminotransferaz Seviyesi ve Alanin Aminotransferaz Seviyesini Etkileyen Faktörler*. Uzmanlık Tezi, Ufuk Üniversitesi, Ankara.
- Güngördü, A., (2007). *Karakaya Baraj Gölünün Su Kalitesinin Ekotoksikolojik Yaklaşımla Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Habig, W. H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* **249** 7130–7139.
- Hayes, J.D., Srange, R.C., (2000). Glutathione S-Transferase Polymorphism and their Biological consequences, *Pharmacology*, **61** 154-166.
- Hayes, W.J. Jr. and Laws, E.R., (1990). *Handbook of Pesticide Toxicology, General Principles* Vol. 1 and 2. Academic Press, Inc., New York.
- Hernández-Moreno, D., Soler, F., Míguez, M.P., Pérez-López, M., (2010). Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin, *Sci. Total Environ.* **408** 4976–4983.
- Hirotsu, K., Goto, M., Okamoto, A., Miyahara, I., (2005). "Dual substrate recognition of aminotransferases". *Chem. Rec.* **5** (3): 160–172.
- Huang, T. L., Obih, P.O., Jaiswal, R., Hartley, W.R. and Thiagarajah, A., (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi River basin, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58** 688–695.
- Inchem (2014). <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v072pr25.htm>
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS), taksonomi seri numarası 163699.
- Johannes, K., Giuseppina, D'A., Nagel, R., Teresa, V., Paola, G., Luciano, V., (1995). Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species, *Sci. Total Environ.* **171** 213-220.
- Jokanović, M., (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, **66** 139–160.
- Juliana, Z.S., Regina, C. R., Fernanda, M. L., Hermeson, F. B., Milene, M. F., Camila de M.G.M., Carlos, Eduardo da R., (2013). Effects of glyphosate on cholinesterase activity of the mussel *Perna perna* and the fish *Danio rerio* and *Jenynsia multidentata*: In vitro studies, *Aquat. Toxicol.* 130– 131 171–173.
- Karaca, M., (2010). *Sucul Sistem Canlılarda Organoklorlu Pestisitlerin Analizi ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Biyogösterge Amaçlı Uygulanması*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.

- Katzung, B.G., (2001). Introduction to autonomic pharmacology. In: *Basic and clinical pharmacology, 8th edition*.. USA: The McGraw Hill Companies, Inc:75–91.
- Kavitha, P., Venkateswara R.J, (2009). Sub-lethal effects of profenofos on tissue-specific antioxidative responses in a Euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* *Ecotox. Environ. Safe.* **72** 1727–1733.
- Kavitha, P., Venkateswara, R.J., (2008). Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*, *Environ. Toxicol. Phar.* **26** 192–198.
- Kazancı, N., Girgin, S. (1998). Three biological methods for assessment and monitoring of water quality of aquatic ecosystems in Turkey, *Proceeding of third aquaculture symposium of Eastern Turkey*. 51-63.
- Kelly, S. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abrama, K. H., Levin, E. D., (1998). Oxidative Stress in Toxicology Established Mammalian and Emerging Piscine Model System. *Environ. Health Persp.* **106** 375-384.
- Kirsch, J.F., Eichele, G., Ford, G., Vincent, M.G., Jansonius, J.N., Gehring. H., et al. (1984). "Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure" *J.Mol. Biol.* **174** (3): 497–525.
- Klaassen, C. D., (2001). *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, New York, p.133–225.
- Klaassen, C. D., (2008). *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*, McGraw-Hill, New York, Seventh Edition.
- Kochhar, S., Christen, P., (1992). "Mechanism of racemization of amino acids by aspartate aminotransferase". *Eur. J. Biochem.* **203** (3): 563–569.
- Köprücü, K., and Aydın, R., (2004). The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae, *Pestic. Biochem. Phys.* **80** 47–53.
- Küster, E., (2005). Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment, *Aquat. Toxicol.* **75** 76–85.
- Lamason, R.L., Mohideen, M.A., Mest, J.R., Wong, A.C., Norton, H.L., Aros, M.C., Juryneć, M.J., Mao, X., Humphreville, V.R., Humbert, J.E., Sinha, S., Moore, J.L., Jagadeeswaran, P., Zhao, W., Ning, G., Makalowska, I., McKeigue, P.M., O'donnell, D., Kittles, R., Parra, E.J., Mangini, N.J., Grunwald, D.J., Shriver, M.D., Canfield, V.A., Cheng, K.C., (2005). SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science* **310**, 1782–1786.
- Lawrence, C., (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review, *Aquaculture* **269** 1–20.
- Li, S., Xie, X., Zhu, G., Tan, Y., (2004). Kinetic characters and resistance to inhibition of crude and purified brain acetylcholinesterase of three freshwater fishes by organophosphates, *Aquat. Toxicol.* **68** 293–299.

- Lindalva, P. M., Claudia B.R.M., (2008). Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*, *Comp. Biochem. Phys., Part C* **148** 265–272.
- Machala, M., Drabek P., Neca, J., Kolarova, J., and. Svobodova, Z., (1998). Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **41** 107–111.
- Marrs, T.C., (1996). Organophosphate anticholinesterase poisoning. *Toxic Substance Mechanisms*; **15** 357–88.
- Martinez-Cabrillo, J.L., et al. (1991). "Responses of populations of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) from northwest Mexico to pyrethroids". *J. Econ. Entomol.* **84** (2): 363–366.
- Martins, J., Oliva Teles, L., Vasconcelos, V., (2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology, *Environ. Int.* **33** 414–425.
- Melpomeni, T., Chrisovalantis, P., Efthimia, A., George, T., (2009). Comparing the inhibitory effects of five protoxicant organophosphates (azinphos-methyl, parathion-methyl, chlorpyrifos-methyl, methamidophos and diazinon) on the spontaneously beating auricle of *Sparus aurata*: An in vitro study, *Aquat. Toxicol.* **94** 211–218.
- Menon, A.G.K., (1999). Check list — fresh water fishes of India. *Rec. Zool. Surv. India. Misc. Publ., Occas. Pap.* **175** (366), 234–259.
- Miao, D., Lusheng, Z., Bo, S., Shaoyuan, Z., Jun, W., Hui, X., Jinhua, W., Fenghua, W., (2013). The effects of endosulfan on cytochrome P450enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers, *Ecotox. Environ. Safe.* 921–925.
- Mohamed, B., (2003). Organophosphorus Ester-Induced Chronic Neurotoxicity, *Arch. Environ. Health*, v.58, n.8.
- Monteiro, M., Quintaneiro C., Nogueira, A. J. A., Morgado, F., Soares A. M. V. M., and Guilhermino, L., (2007). Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus microps* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast, *Chemosphere*, **66** 514–522.
- Morita, H., Yanagisawa, N., Nakajima, T., Shimizu, M., Hirabayashi, H., Okudera, H., Nohara, M., Midorikawa, Y., Mimura, S., (1995). Sarin poisoning in Matsumoto, Japan. *Lancet* **346**, 290–293.
- Narahashi, T., (1996). Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol. Toxicol.* 781–14.
- Nelson, D. L. and. Cox, M. M., (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*, (fourth ed.), Worth Publishers, New York, p. 577.
- Nousiainen, U., Torronen R., (1984). Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in rat liver by in vivo and in vitro inhibition, *Gen. Pharmacol.* **15** 223–227.

- Oruç, E.Ö., (2010). Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos, *Pestic. Biochem. Phys.* **96** 160–166.
- Önal, U., Langdon, C.J., (2000). Characterization of two microparticle types for delivery of food to altricial fish larvae. *Aquac. Nutr.* **6**, 159–170.
- Ören, P. (2009). *Malathion'un Oreochromis niloticus'ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Özmen, M., Dominguez, S.E., Fairbrother, A., (1998). Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60** 194–201.
- PAN (2010). Pesticide Action Network, *An impression of recent scientific literature*, Health Effects of Pesticides and Environmental Effects of Pesticides.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D. and Fontainhas Fernandes, A., (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*, *Pestic. Biochem. Physiol.* **85** 91–96.
- Penberthy, W.T., Shafizadeh, E., Lin, S., (2002). The zebrafish as a model for human disease. *Front. Biosci.* **7**, 9–1453.
- Pretti, C. and Cognetti-Varriale A. M., (2001). The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases, *Aquat. Conserv.* **11** 299–303.
- Prieto-Alamo, M.J., Abril, N., Pueyo, C., (1993). Mutagenesis in *Escherichia coli* K-12 Mutants Defective in Superoxide Dismutase or Catalase, *Mutat. Res-Fund. Mol. M.* **14** 237–244.
- Rahul, S., Bhanushree G., Acharya J., Kaushik M.P., Kallol K., (2014). Interactions between xylene-linked carbamoyl bis-pyridinium mono-oximes and organophosphates inhibited-AChE: A kinetic study, *Toxicology* **316**, 1–8.
- Ramalingam, K., Antony A.J., (1990). Subacute Toxicity of Phosalone on Liver and intestinal Phosphatases of *Rana tigrina* (Daudin), *Natl Acad. Sci. Lett.-India*, **13** 383–387.
- Ray, D.E, Fry, J.R., (2006). A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacol. Therap.* **111**, 174–193.
- Ross, M.K., Borazjani, A., Edwards, C.C., Potter, P.M, (2006). Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases, *Biochem. Pharm.* **71** 657–669.
- Sancho, E., Villarroel, M.J., Fernandez, C., Andreu, E., Ferrando, M.D., (2010). Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*), *Ecotox. Environ. Safe.* **73** 370–376.
- Sandra, G.V., Pablo, S., Juan C. S.H., (2010). Tissue-specific inhibition and recovery of esterase activities in *Lumbricus terrestris* experimentally exposed to chlorpyrifos, *Comp. Biochem. Phys., Part C* **151** 351–359.

- Santhoshkumar, P., Shivanandappa,T., (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver, *Chem. Biol. Interact.* 119-120, 277-282.
- Scaps, P., Demuynck, S., Descamps, M., Dhainaut, A., (1997). Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*, *Arch. Environ. Con. Tox.* **33** 203-208.
- Schmidt, K., Staaks, G. B. O., Pflugmacher, S., and Steinberg C. E. W., (2005). Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*), *Aquat. Toxicol.* **71** 49-59.
- Shafer, T.J., Meyer D.A., Crofton K.M., (2005). Developmental neurotoxicity of pyrethroid insecticides: Critical review and future research needs. *Environ. Health Perspect* **113** 123–136.
- Singh, R.K. and Sharma,B., (1998). Carbafulan- induced biochemical changes in *Clarias batrachus*, *Pestic. Sci.* **53** 285-290.
- Smith, C., Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., (2007). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews* **83** (1) 13–34.
- Soderlund, D.M., Clark J.M., Sheets L.P., et al (2002). Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171** 3–59.
- Spence, R., Smith, C., (2006). Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behav. Ecol.* **17**, 779–783.
- Srivastava, A.S., Oohara, L., Suzuki, T. and Singh, S.N. (1990). Activity and expression of aspartate aminotransferase during the reproductive cycle of a fresh water fish, *Clarias batrachus*. *Fish Physiol. Biochem.* **20**, 243-250.
- Stern, H.M.; Zon L.I., (2003). Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish, *Nature Review Cancer*, **3** 533-539.
- Strange, R.C., Jones,P.W., Fryer,A.A., (2000). Glutathione S-Transferase: Genetics and role in toxicology, *Toxicol. Lett.* **112** 357-363.
- Suvetha, L., Ramesh,M., Saravanan,M., (2010). Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*, *Environ. Toxicol. Phar.* **29** 44–49.
- Şişman, T., (2007). *Poliklorlu Bifenil Bileşiklerinin Danio rerio'nun (Zebra Balığı) Gelişimi Üzerine Etkileri*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Terada, T. (2005). Role of glutathione S-transferase in lens under oxydative stres. *J. Health Sci.* **51** 263-271.
- Thompson, H. M., (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates, *Ecotoxicology*, **8** 369–384.

- U.S. Environmental Protection Agency. (1987). Pesticide Fact Sheet Number 148. US EPA, Office of Pesticide Programs, Registration Div., Washington, DC.
- U.S. EPA. (2012). Basic Information". *Clothianidin – Registration Status and Related Information*.
- United States Environmental Protection Agency (2002). Permethrin, Resmethrin, Sumithrin: Synthetic Pyrethroids For Mosquito Control. Retrieved 2008-04-04.
- Ünal, E.D., (2010). *Kuzey Doğu Akdeniz’de (Mersin Körfezi) Deniz Suyu, Sediman ve Biyotada Organik Klorlu Pestisit Kirlilik Düzeyinin Araştırılması*, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin.
- Üner, N., Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y., Şahin, N., Durmaz, H., Usta, D., (2006). Effects of diazinon on acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain of *Oreochromis niloticus*, *Environ. Toxicol. Phar.* **21** 241–245.
- Vaglio and Landriscina C. (1999). Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**, 111-116.
- Vale, J.A. (1998). Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorus Insecticide Poisoning. *Toxicol. Lett.* 102-103, 649-652.
- Van der Oost R., Beyer,J., Vermeulaen,P.E, (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, *Environ. Toxicol. and Pharmacol.* **13** 57-149.
- Varo’, I., Amat, F., Navarro,J.C., (2008). Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species, *Aquat. Toxicol.* **88** 53–61.
- Viran, R., Erkoç, F.Ü., Polat, H., and Koçak, O., (2003). Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*), *Ecotox. Environ. Safe.* **55** 82–85.
- Wang, X., Xing, H., Jiang, Y., Wu, H., Sun, G., Xu, Q., Xu, S., (2013). Accumulation, histopathological effects and response of biochemical markers in the spleens and head kidneys of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos, *Food Chem. Toxicol.* **62** 148–158.
- Washington University (2014). <http://depts.washington.edu/opchild/acute.html>
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture* **34**, 115–145.
- Watanabe, T., Masakatsu, I., Motoko, I., Masaru, K., Yoshihisa, K., Atsushi, K., Shigeru, O., (2006). "Spot pattern of leopard Danio is caused by mutation in the zebrafish connexin 41.8 gene". *EMBO reports* **7** (9): 893–7.
- Wheelock, C. E., Shan, G.and Ottea,J., (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides, *J.Pestic. Sci.* **30** 75–83.
- Wogram, J., Sturm,A., Segner, H.and Liess,M., (2001). Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in

threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure, *Environ. Toxicol. Chem.* **20** 1528–1531.

- Xiangguo, S., Aihua, G., Guixiang, J., Yuan, L., Jing, D., Jing J., Fan, H., Yan, L., Yankai, X., Chuncheng, L., Ling, S., Shoulin, W., Xinru, W., (2011). Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish, *Chemosphere* **85** 1010–1016.
- Yan, T., Tee, L.H., Sin Y.M., (1997). Effect of Mercury and Lead on Tissue Glutathione of the Green Mussel, *Perna viridis* L., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58** 845–850.
- Yang, Y., Ma, H., Zhou, J., Liu, J., Liu, W., (2014). Joint toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish, *Chemosphere* **96** 146–154.
- Yuan, G., Yen B.T., Paul C., Phil B., Ilias L.K., (2014). Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles, *Enzyme Microb. Tech.* **54**, 38–44.
- Yuanxiang, J. Shanshan Z., Yue P., Linjun S., Liwei S., Weiping L., Zhengwei F., (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere* **82** 398–404.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Volkan KORKMAZ
Doğum Yeri ve Tarihi :Elazığ - 01.11.1984
Adres : Nailbey Mah. Bağlar Sok. No:31/1 23100 ELAZIĞ
E-mail : vkorkmaz23@gmail.com
Lisans :İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Biyoloji
Öğretmenliği Bölümü, Malatya (2002-2007)
Yüksek Lisans :Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, Elazığ (2007-2009)

Yayın Listesi :

1. O.S. Okay , B. Karacık , A. Güngördü , M.Ozmen, A. Yılmaz , N.C. Koyunbaba , S.D. Yakan, **V. Korkmaz**, B. Henkelmann, K.-W. Schramm, Micro-organic pollutants and biological response of mussels in marinas and ship building/breaking yards in Turkey, **Science of the Total Environment** 496 (2014) 165–178.

Tezden Türetilen Sunumlar : Sipermetrin, Fosalon İnsektisitleri ve Karışımlarının Toksik Etkilerin Zamana Bağlı Geridönüşürlüğünün Zebrabalığında (*Danio rerio*) Değerlendirilmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir. (Poster Sunumu)