

***Limnodrilus profundicola* (VERRİL 1871) KOLİNESTERAZ ve
ETOKSİREZORUFİN O-DEETİLİZ AKTİVİTELERİNİN
BİYOMARKÖR OLARAK KULLANILMASININ
ARAŞTIRILMASI**

Adile ÖZDEMİR

**Ekim, 2006
DENİZLİ**

***Limnodrilus profundicola* (VERRİL 1871) KOLİNESTERAZ ve
ETOKSİREZORUFİN O-DEETİLİZ AKTİVİTELERİNİN
BİYOMARKÖR OLARAK KULLANILMASININ
ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı**

Adile ÖZDEMİR

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN
Yardımcı Danışman: Prof. Dr. Alaattin ŞEN**

**Ekim, 2006
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Adile ÖZDEMİR tarafından Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN ve Prof. Dr. Alaattin ŞEN yönetiminde hazırlanan “*Limnodrilus profundicola* (Verril 1871) Kolinesteraz ve Etoksirezorufin O-deetilaz Aktivitelerinin Biyomarkör Olarak Kullanılmasının Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



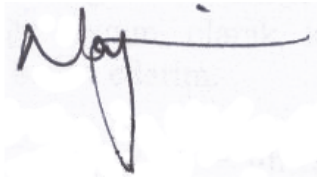
Prof. Dr. Orhan ADALI
Jüri Başkanı



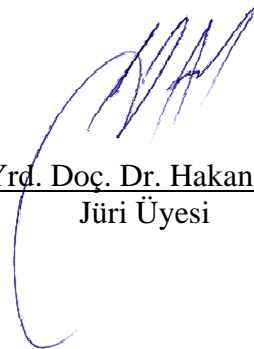
Prof. Dr. Alaattin ŞEN
Jüri Üyesi (Yrdımcı Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN
Jüri Üyesi (Danışman)



Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Hakan AKÇA
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..../.....
Tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet Ali SARIGÖL

Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her konuda göstermiş oldukları ilgi, destek, anlayış ve yardımları için sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN ve Prof. Dr. Alaattin ŞEN'a teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Tezin incelenmesi sırasında yönlendirici eleştiri ve katkılarından dolayı sayın jüri üyeleri Prof. Dr. Orhan ADALI, Prof. Dr. Alaattin ŞEN, Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN, Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN ve Yrd. Doç. Dr. Hakan AKÇA'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarım süresince her türlü yardım ve desteğini, bilgilerini esirgemeyen yardımcı danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Alaattin ŞEN ve çalışmalarım süresince numune temini için arazi çalışmalarında bana yardımcı olan tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN'a tekrar teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.


Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Daire Başkanlığına maddi destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

Pamukkale Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma anlayış ve yardımları için çok teşekkür ediyorum.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim esnasında tezimin her aşamasında göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı sevgili anneme, babama ve kardeşlerime şükranlarımı ve sevgilerimi sunuyorum.

Adile ÖZDEMİR

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza : 
Öğrencinin Adı Soyadı : Adile ÖZDEMİR

ÖZET

Limnodrilus profundicola (VERRİL 1871) KOLİNESTERAZ ve ETOKSİREZORUFİN O-DEETİLİZ AKTİVİTELERİNİN BİYOMARKÖR OLARAK KULLANILMASININ ARAŞTIRILMASI

ÖZDEMİR, Adile

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji ABD

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN

Yardımcı Yönetici: Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Ekim 2006, 94 Sayfa

Bu çalışmada, Büyük Menderes Nehri'nin bir kolu olan Çürüksu Çayı üzerinde farklı istasyonlardan toplanan oligoket *Limnodrilus profundicola*'ların homojenizasyonu ile mikrozomal ve sitozolik fraksiyonlar elde edildi. *L. profundicola*'larda sitozolik kolinesteraz (ChE) karakterizasyonu, asetiltiyokolin (ATC), propiyoniltiyokolin (PTC) ve butiriltiyokolin (BTC) substratları kullanılarak gerçekleştirildi. ChE aktivitesi; asetilkolinesteraz (AChE), propiyonilkolinesteraz (PChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) için sırasıyla 50 µg, 50 µg ve 100 µg protein miktarına ve 150 saniye reaksiyon zamanına kadar lineerlik göstermiştir. Optimum pH ve sıcaklık her üç substrat için pH 8,5 ve 35 °C olarak bulunmuştur. AChE, PChE ve BChE için enzim aktivitesinin sırasıyla 7,5 µM ATC, 5 µM PTC ve 2,5 µM BTC konsantrasyonu üzerinde sature olduğu gözlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak yapılan saptamalarda AChE, PChE ve BChE için V_{max} ve K_m değerleri sırasıyla 8636 U/dak/mg protein ve 1,202 mM; 6064 U/dak/mg protein ve 0,537 mM; 3065 U/dak/mg protein ve 0,560 mM olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmalarda *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine organofosfat, karbamat ve piretroid insektisitlerin etkisi incelenmiş ve insektisitlerin enzim aktivitelerini inhibe ettiği bulunmuştur. Bununla birlikte Çürüksu Çayı üzerinde belirlenen farklı istasyonlardan toplanan *L. profundicola* bireylerinde AChE aktiviteleri ölçülmüş ve farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca, Sitokrom P4501A1 (CYP1A1) induksiyonunu anlamak için EROD aktivitesi, 7-Etoksirezorufin substratı kullanılarak ölçülmüştür. CYP1A1 ve CYP4A ekspresyon düzeylerinin saptanması için Western blot analizleri, anti-Rat CYP1A1 ve CYP4A antikorları kullanılarak yapılmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada kirliliğe duyarsız olmayan ama dirençlilik kazanabilen, kirli ve temiz sularda yaşayabilen kozmopolit bir tür olan *L. profundicola*'nın geniş çeşitlilikteki çevresel koşullara adaptasyonu ile kirlilik ve ekotoksikoloji çalışmalarında biyomarkör organizma olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kolinesteraz, *Limnodrilus profundicola*, CYP1A1, biyomarkör

Prof. Dr. Orhan ADALI

Prof. Dr. Alaattin ŞEN

Yrd. Doç. Dr. Mustafa DURAN

Yrd. Doç. Dr. Nazime MERCAN

Yrd. Doç. Dr. Hakan AKÇA

ABSTRACT**INVESTIGATION OF USING *Limnodrilus profundicola* (VERRIL 1871)
CHOLINESTERASE AND ETHOXYRESORUFIN O-DEETILASE
ACTIVITIES AS A BIOMARKER**

OZDEMIR, Adile

M. Sc. Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Mustafa DURAN

Co-adviser: Prof. Dr. Alaattin SEN

October 2006, 94 Pages

In this study, oligochaete *Limnodrilus profundicola* collected from different sites along Curuksu stream on Menderes River were homogenized and microsomal and cytosolic fractions were prepared. Characterization of cytosolic cholinesterase (ChE) activities were carried out using acetylthiocholine (ATC), propionylthiocholine (PTC) and butyrylthiocholine (BTC) substrates. AChE, PChE and BChE activities were found to be linear with respect to 50, 50 and 100 µg protein concentrations, respectively for 150 seconds incubation time. Optimum pH and temperature have found to be pH 8.5 and 35 °C for all substrate. It has been observed that AChE, PChE and BChE enzyme activities have saturated at and above 7.5 mM ATC, 5 mM PTC and 2.5 mM BTC concentrations, respectively. Apparent V_{max} and K_m values of AChE, PChE and BChE were determined using Lineweaver-Burk graph and calculated as 8636 U/min/mg proteins and 1,202 mM; 6064 U/min/mg proteins and 0,537 mM; 3065 U/min/mg proteins and 0,560 mM, respectively. In our studies, the effects of organophosphorous, carbamate and piretroid insecticides on *L. profundicola* cytosolic ChE activities were investigated and were found that these insecticides have inhibitory effects. AChE activities of *L. profundicola* collected from different stations of Curuksu Stream have measured and were observed to be different. In addition, for Cytochrome P4501A1 induction, EROD activity has been measured using 7-ethoxyresorufin as substrate. CYP1A1 and CYP4A expression levels were also determined by Western blot analysis using anti-Rat CYP1A1 and CYP4A antibodies. Consequently, *L. profundicola* which is a cosmopolitan organism with a reputation for being very resistant but not insensitive to pollution can adapt to a wide range of environmental conditions and our results suggests that *L. profundicola* can be used as a biomarker organism for organic pollution and ecotoxicological studies.

Keywords: Cholinesterase, *Limnodrilus profundicola*, CYP1A1, biomarker.

Prof. Dr. Orhan ADALI

Prof. Dr. Alaattin SEN

Asst. Prof. Dr. Mustafa DURAN

Asst. Prof. Dr. Nazime MERCAN

Asst. Prof. Dr. Hakan AKCA

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU	i
TEŞEKKÜR	ii
ETİK SAYFASI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Esterazlar	3
1.1.1. Kolinesterazlar	3
1.1.1.1. Asetilkolinesteraz.....	5
1.1.1.2. Butirilkolinesteraz.....	7
1.2. Çeşitli İnvertebrat Türleri ile Yapılan ChE Çalışmaları	8
1.3. Sitokrom P450 ve CYP1A1	14
1.4. Çalışmanın Amacı	17
2. MATERYAL ve METOT	19
2.1. Materyaller	19
2.1.1. Deney hayvanı	19
2.1.2. Kullanılan kimyasallar	20
2.2. Metotlar	21
2.2.1. Canlıların temini	21
2.2.2. Canlıların sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlarının hazırlanması.....	22
2.2.3. Protein miktarının tayini	23
2.2.4. <i>L. profundicola</i> sitozolik kolinesteraz aktivite tayini	23
2.2.4.1. Asetiltiyokolin (ATC) aktivitesi	23
2.2.4.2. Propiyoniltiyokolin (PTC) aktivitesi.....	25
2.2.4.3. Butiriltiyokolin (BTC) aktivitesi.....	26
2.2.5. ChE aktivitesinin <i>L. profundicola</i> sitozollerinde karakterizasyonu.....	27
2.2.5.1. Protein miktarının ChE aktivitesi üzerine etkisi	27
2.2.5.1.1. AChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi.....	27
2.2.5.1.2. PChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi	27
2.2.5.1.3. BChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi.....	28
2.2.5.2. ChE aktivitesi üzerine pH etkisi	28
2.2.5.3. ChE aktivitesine inkübasyon sıcaklığının etkisi	28
2.2.5.4. ChE aktivitesinin zamanla değişimi.....	28
2.2.5.5. ChE aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi.....	28
2.2.5.5.1. ATC konsantrasyonunun etkisi.....	28
2.2.5.5.2. PTC konsantrasyonunun etkisi	29

2.2.5.5.3. BTC konsantrasyonunun etkisi.....	29
2.2.5.6. <i>L. profundicola</i> sitozolik kolinesteraz aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> paraokson-metil inhibisyonu.....	29
2.2.6. <i>L. profundicola</i> sitozolik kolinesteraz aktivitesi üzerine <i>in vivo</i> insektisit ve petrokimyasal atık etkisi	30
2.2.7. <i>L. profundicola</i> etoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz (EROD) aktivite tayini.....	30
2.2.8. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	32
2.2.8.1. Stok çözeltiler	32
2.2.8.1.1. 10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30)	32
2.2.8.1.2. Stok ayrıştırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80)	32
2.2.8.1.3. Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80).....	32
2.2.8.1.4. Stok jel çözeltisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C)	32
2.2.8.1.5. %10 SDS.....	33
2.2.8.1.6. %10 Amonyum persülfat (APS)	33
2.2.8.1.7. 4X Numune seyreltme tamponu	33
2.2.8.1.8. Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri.....	33
2.2.8.1.9. Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması.....	33
2.2.8.2. Prosedür	34
2.2.8.2.1. Jelin hazırlanması.....	34
2.2.8.2.2. Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması	35
2.2.8.2.3. Örneklerin yüklenmesi.....	35
2.2.8.2.4. Elektroforetik ayrıştırma.....	35
2.2.8.2.5. Jelin boyanması ve bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması	36
2.2.8.3. Western blot analizleri	36
2.2.8.3.1. Proteinlerin elektroforezi	36
2.2.8.3.2. Transfer sandiviçinin hazırlanması	37
2.2.8.3.3. Elektroforetik transfer.....	38
2.2.8.3.4. Proteinlerin immünokimyasal tespiti	38
2.2.9. İstatistiksel analizler.....	39
3. BULGULAR.....	40
3.1. <i>L. profundicola</i> Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonlarda Protein Tayini	40
3.2. <i>L. profundicola</i> Sitozolik ChE Aktivitesinin Tayini	40
3.3. ChE Aktivitesinin <i>L. profundicola</i> Sitozollerinde Karakterizasyonu	40
3.3.1. <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	40
3.3.2. <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine pH etkisinin tayini.....	41
3.3.3. <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi tayini	42
3.3.4. <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesinin zamana karşı değişimi	43
3.3.5. <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin tayini.....	44
3.3.5.1. ATC konsantrasyonunun etkisinin tayini.....	44
3.3.5.2. PTC konsantrasyonunun etkisinin tayini	45
3.3.5.3. BTC konsantrasyonunun etkisinin tayini.....	46
3.3.6. <i>L. profundicola</i> ChE aktivitesi üzerine <i>in vitro</i> paraokson-metil inhibisyonu tayini.....	47
3.3.6.1. AChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu	47
3.3.6.2. PChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu	48
3.3.6.3. BChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu	49
3.4. <i>L. profundicola</i> ChE Aktivitesi Üzerine <i>in vivo</i> İsektisit ve Petrokimyasal Atık Etkisinin Tayini	50

3.4.1. Metomil etkisi	50
3.4.2. Deltametrin etkisi.....	51
3.4.3. Metil-paratyon etkisi.....	52
3.4.4. Atık çamur etkisi.....	53
3.4.5. Atık su etkisi	54
3.5. Çürüksu Çayı Üzerinde Belirlenen İstasyonlardan Toplanan <i>L. profundicola</i> Bireylerinde ChE Aktivite Değişimleri	55
3.6. <i>L. profundicola</i> Mikrozomal EROD Aktiviteleri	56
3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve Western Blot Analizleri	60
4. TARTIŞMA	64
5. SONUÇ	77
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 <i>Limnodrilus profundicola</i> 'nın sistematigi	19
Tablo 2.2 Tipik AChE aktivite ölçüm karışımının içeriği	24
Tablo 2.3 Tipik PChE aktivite ölçüm karışımının içeriği	26
Tablo 2.4 Tipik BChE aktivite ölçüm karışımının içeriği	27
Tablo 2.5 EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği	31
Tablo 2.6 4X numune sulandırma tamponunun içeriği	33
Tablo 2.7 SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları	34
Tablo 2.8 Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama	39
Tablo 4.1 Çürüksü Çayı üzerinden toplanan <i>L. profundicola</i> bireylerinde sitozolik ChE karakterizasyonu verileri ve <i>in vitro</i> paraoxon-metil inhibisyonu	66
Tablo 4.2 Çürüksü Çayı üzerinde belirlenen istasyonlardan toplanan <i>L. profundicola</i> bireylerinde sitozolik ChE aktiviteleri	69
Tablo 4.3 Metomil, deltametrin, metil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde sitozolik ChE aktiviteleri	70
Tablo 4.4 Metomil, deltametrin, metil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde mikrozomal EROD aktiviteleri	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 <i>Limnodrilus profundicola</i>	20
Şekil 2.2 Çürüksu Çayı üzerindeki <i>L. profundicola</i> toplama istasyonları (1. , 2. ve 3. sırası ile istasyonları göstermektedir).....	22
Şekil 2.3 ChE aktivitesinin DTNB ve ATC kullanılarak tayini.....	24
Şekil 2.4 ChE aktivitesinin DTNB ve PTC kullanılarak tayini	25
Şekil 2.5 ChE aktivitesinin DTNB ve BTC kullanılarak tayini	26
Şekil 2.6 Paraokson-metil'in moleküler yapısı	29
Şekil 2.7 Deltametrin (a), Metil-paratyon (b) ve Metomil (c)'in moleküler yapıları ...	30
Şekil 2.8 Etoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz reaksiyonu	31
Şekil 3.1 Protein konsantrasyonun <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi	41
Şekil 3.2 pH'ın <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi	42
Şekil 3.3 Sıcaklığının <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi	43
Şekil 3.4 <i>L. profundicola</i> sitozolik ChE aktivitesinin zamanla değişimi.....	44
Şekil 3.5 <i>L. profundicola</i> sitozolik AChE, PChE ve BChE substrat saturasyon grafiği	45
Şekil 3.6 <i>L. profundicola</i> sitozolik AChE, PChE ve BChE Lineweaver-Burk substrat saturasyon grafiği.....	46
Şekil 3.7 <i>L. profundicola</i> sitozolik AChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dikson plot grafiği.....	47
Şekil 3.8 <i>L. profundicola</i> sitozolik PChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dikson plot grafiği.....	48
Şekil 3.9 <i>L. profundicola</i> sitozolik BChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dikson plot grafiği.....	49
Şekil 3.10 Metomil'e maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi	50
Şekil 3.11 Deltametrin'e maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi	51
Şekil 3.12 Metil-paratyon'a maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi	52
Şekil 3.13 Atık çamura maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi	53
Şekil 3.14 Atık suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi	54
Şekil 3.15 Farklı bölgelerden toplanan <i>L. profundicola</i> bireylerinde ChE aktiviteleri..	55
Şekil 3.16 Metomil'e maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> mikrozoamlarında EROD aktiviteleri.....	56
Şekil 3.17 Deltametrin'e maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> mikrozoamlarında EROD aktiviteleri.....	57
Şekil 3.18 Metil-paratyon'a maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> mikrozoamlarında EROD aktiviteleri.....	58

Şekil 3.19 Atık çamura maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> mikrozoamlarında EROD aktiviteleri.....	58
Şekil 3.20 Atık suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> mikrozoamlarında EROD aktiviteleri.....	59
Şekil 3.21 Metomil, deltametrin, metil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> 'lar ile 3-MC-Rat mikrozoamlarında SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	60
Şekil 3.22 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> 'lar ile rat mikrozoamlarında SDS-poliakrilamid jel elektroforezi	61
Şekil 3.23 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> 'lar ile rat mikrozoamlarında sitokrom P4501A1'in poliklonal anti-Rat CYP1A1 IgG kullanılarak immünoblot analizleri	62
Şekil 3.24 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan <i>L. profundicola</i> 'lar ile rat mikrozoamlarında sitokrom P4504A'nın poliklonal anti-Rat CYP4A1,2,3 IgG kullanılarak immünoblot analizleri	63

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ε-ACA	ε-Amino kaproik asit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
°C	Santigrat derece
AβMTC	Asetil-β-metiltiyokolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ATC	Asetil tiyokolin
APS	Amonyum persülfat
BaP	Benzo[a]piren
BChE	Butirilkolinesteraz
BCIP	5-Bromo-4-kloro-3-indol fosfat
BCNU	1,3-Bis (2 kloretil)-1-nitroüre
BTC	Butiril tiyokolin
BHT	Butile hidroksi toluen
BIS	N, N'-metilen bisakrilamid
BSA	Sığır serum albumin
CaCl ₂	Kalsiyumklorür
CAT	Katalaz
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamino]-1-propan sülfat
ChE	Kolinesteraz
DDT	Diklor difenil trikloretan
DEA	Dietanolamin
dak	Dakika
DTNB	5, 5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (3, 3'-6)
EC ₅₀	Populasyondaki bireylerin %50'sini etkileyici konsantrasyon
ECOD	Etoksikumarin- <i>O</i> -deetilaz
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EROD	7-etoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz
g	Gram
G6PDH	Glukaz 6-fosfat dehidrogenaz
GST	Glutasyon S-transferaz
HCl	Hidroklorikasit
<i>ki</i>	Biyomoleküler kararlılık hızı
<i>K_m</i>	Michaelis-Menten sabiti
KPi	Potasyum fosfat
LD ₅₀	Populasyondaki bireylerin %50'sini öldürücü doz
lt	Litre
3-MC	3-metilkolantren
MROD	Metoksirezorufin- <i>O</i> -deetilaz

mA	Miliamper
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
NADPH	β -Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	Nitro blue tetrazolium
ng	Nanogram
nm	Nanometre
OP	Organofosfatlı insektisit
PAH	Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PCB	Poliklorlu bifenil
PChE	Propiyonilkolinesteraz
PMSF	Fenil metil sülfonil florid
pmol	Pikomol
pM	Pikomolar
ppt	Bindelik birim
PTC	Propiyonil tiyokolin
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
sa	Saat
sn	Saniye
TBST	Tris tampon tuzu Tween 20
TCDD	2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin
TEMED	N, N, N', N'-Tetrametil etilen diamin
Tween 20	Polietilen sorbiton monolaurat
UV	Ultraviyole
U	Ünite
V	Volt
V_{max}	Maksimum hız

1. GİRİŞ

Hızla gelişen sanayi ve artan kentleşmenin sonucu olarak çevreye verdiğimiz zarar da artmaktadır. Her geçen gün artan sanayi kuruluşlarının endüstriyel atık sularının ve evsel atık suların deniz, göl ya da nehirlerimize verilmesi, bitki zararlıları ile mücadelede kullanılan ve canlı organizmalar üzerinde toksik ve karsinojenik etkiye sahip insektisitler, herbisitler gibi çeşitli pestisitlerin kullanımının artması ile artan çevresel kirlilik birçok canlı türünün yaşamını tehlikeye sokmaktadır.

Yirmibirinci yüzyılın en büyük sorunlarından biri olan kullanılabilir su kaynaklarının tüketiminin artmasına rağmen, tüm canlıların yaşamı için zorunlu su kaynakları çeşitli şekillerde bir o kadar da hızla kirlenmektedir. Endüstriyel ve evsel atık suların direk olarak alıcı ortamlara verilmesi sonucu her geçen gün akuatik ortamlar kirlenmekte ve bu ortamlarda yaşayan organizmalar olumsuz yönde etkilenmektedir. Akuatik alanlara deşarj edilen atık sular, içerdikleri ağır metaller, toksik bileşikler, azotlu ve karbonlu organik ve inorganik bileşikler ile bazı canlı türlerinin ölümüne, toleranslı türlerde ise fizyolojik ve morfolojik değişimlere neden olmaktadır.

1945'ten bu yana tarım alanlarındaki ürünler, ev bahçelerindeki bitkiler ve çim alanları pestisit olarak bilinen ve zararlı olarak kabul edilen, çeşitli organizmaları öldüren değişik kimyasallarla muamele edilmektedir. Zararlılarla mücadelede kullanılan insektisitler, herbisitler, fungusitler ve rodentisitler gibi pestisitler canlılar üzerinde çeşitli toksik etkilere sahiptirler. Özellikle, klorlandırılmış hidrokarbonlar (DDT, aldrin, dieldrin, endrin, toksafen, lindan, klordan gibi), organofosfatlar (OP) (paratyon, metil-paratyon, malatyon, diazinon, sülfrofos, klorfiryifos, monokrotofos, triklorfon gibi), karbamatlar (karbaril, maneb, aldikarb, aminokarb, metomil, tiyodikarb, karbofuran, priopoksor gibi) ve piretroidler (permetrin, deltametrin, dekametrin, tetrametrin, sipermetrin, fenvalerat, esfenvalerat, siyhalettrin gibi) gibi insektisitler günümüzde yaygın olarak kullanılmakta ve direk ya da dolaylı olarak bu kirleticilere maruz kalan canlı organizmalar üzerinde ya toksik ve karsinojenik etkilere

ya da çeşitli direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olmaktadır. Özellikle, bu toksik bileşiklerin direk ya da dolaylı yollarla akuatik ortamlara ulaşması akuatik canlıların yaşamını da tehliye sokmaktadır.

Tatlı su sistemleri, mahsulü koruma amaçlı yapılan kasıtlı uygulamalar (Crane vd 1995) ve böceklerin kontrolü ya da dökülme, arazi drenajı, sürüklenme gibi kasıtsız uygulamalarla insektisitlerce kirletilebilmektedir (Day ve Scott 1990, Crane vd 2002). Böylece, nehir ve göllerde yaşayan akuatik invertebratlar subletal den letale değişen çeşitli insektisit konsantrasyonlarına maruz kalabilmektedirler (Crane vd 2002). Yüksek insektisit konsantrasyonları sudaki invertebrat komunitelerinin etkilenmesine neden olmaktadır (Maycock vd 2003). Örneğin, doğal sularda bulunan pestisitler, balıklarda asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonuna neden olmakla birlikte enzimin tekrar sentezini (Szabo vd 1992) ve hormonal durumunu (Guhathakurta ve Bhattacharya 1988) da etkilemekte ve kas proteinleri ile RNA seviyelerini azaltmaktadır (Das ve Mukherjee 2000, Abdel-Halim vd 2006). Daha fazla OP indüklenmiş morfolojik anormallikler görülmektedir (Lien vd 1997, Abdel-Halim vd 2006). Beyin AChE inhibisyonu büyümenin erken safhasında bulunan bir balıkta kesinlikle hayatta kalma kabiliyetini azaltacak fizyolojik ve davranışsal modifikasyonlara neden olmaktadır (Pan ve Dutta 1998, Abdel-Halim vd 2006). Ölümlülük oranı maruziyet seviyesinin artması ile artmakta ve yüksek uyarımın şekline göre ölüm gerçekleşene kadar düzensiz durum ve aktivitede azalma görülmektedir (Hussein ve El-Sarha 1993, Abdel-Halim vd 2006).

Su, sediment ya da uygun biyomarkör organizmalar kullanılarak geliştirilen çeşitli metodlarla kirliliğin boyutları saptanabilmektedir. Özellikle enzim aktivite ölçümleri ile düşük seviyelerdeki kirliliği saptamak için kullanılan biyomarkörler, akuatik ekosistemlerin ekolojik risk değerlendirmelerinde gittikçe daha fazla kullanılmaktadır. Bu biyomarkörler, pestisitler gibi ksenobiyotiklerce neden olunan etkileri ve maruziyet oranını saptamak için potansiyel öneme sahiptirler. Böylece, biyolojik organizasyonlarda yüksek seviyelerdeki potansiyel zarar etkileri için erken tespit yapılabilmektedir (McCarthy ve Shugart 1990, Callaghan vd 2002).

Çeşitli tipte çevresel kirleticilere maruz kalan canlılarda, özellikle böceklerde, direnç mekanizması ile ilgili enzimlerden Esterazlar, Glutathion-S-Transferazlar, P450 bağımlı Monooksijenazlar ve Hidrolazlar en çok bilinenleridir.

1.1. Esterazlar

Esteraz enzimleri feromen ve hormon metabolizması, sindirim sistemi ve sinir iletimi, üreme davranışı ve insektisitlere direnç gibi bir çok mekanizmada rol oynamaktadır. Esteraz enzimlerinin Asetil esterazlar, Aril esterazlar, Karboksil esterazlar (CaE) ve Kolin esterazlar (ChE) olmak üzere 4 sınıfı bulunmaktadır. CaE (EC 3.1.1.1)'lar α,β -hidrolaz proteinleridir ve gen ürünlerinin birçok dokunun endoplazmik retikulumunda lokalize olduğu bir çokgenli supraileyi oluşturmaktadırlar (Hosokawa vd 1987, 1990, 1995, 2001, Maki vd 1991, Satoh vd 1994, Yamada vd 1994, Satoh ve Hosokawa 1995, 1998, Takayama vd 1998, Mori vd 1999, Satoh 2005). Bu enzimler ester ve amid-bağı içeren geniş çeşitlilikteki ilaçların hidrolizini katalizlemektedirler (Satoh 2005). OP insektisitlerin en önemli toksikolojik etkilerini esterazların merkezi sinir sisteminde geri dönüşümsüz fosforilasyonu ile sağladıkları bildirilmiştir (Aldridge ve Reiner 1972; WHO 1986, Sogorb ve Vilanova 2002). OP ve karbamat pestisitler ChE aktivitesini spesifik olarak inhibe etmektedirler (O'Brien 1960) ve ChE aktivitesinin ya sucul çevrelerin bu bileşiklerce kirletildiğine ya da balıkların bu bileşiklere maruz kaldığına dair bir biyoindikatör olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Zinkl vd 1991, Chuiko vd 2003) .

1.1.1. Kolinesterazlar

Protozoon ve süngerlerde de saptanan ve hayvanlar aleminde tüm canlılarda bulunan kolinesterazlar serin hidrolazların bir sınıfıdır (Wilson ve Cabib 1956, Talesa vd 1993b, Marcel vd 1998, Stojan vd 2004, Focardi vd 2006). Kolinesterazlar, kolin esterleri iki basamakta hidrolize ederler: enzimin açılması ve bunu takip eden su molekülü ile ilişkili deaçilasyon (Wilson ve Cabib 1956, Stojan vd 2004). Kolinesterazlar (ChE) ve karboksilesterazlar (CaE) asetilkolinesteraz ve juvenil hormon esteraz gibi oldukça özelleşmiş fonksiyonlara sahip üyelerinin bulunduğu α,β -hidrolaz ailesi olarak adlandırılan protein süper ailesine aittirler (Cygler vd 1993, Marcel vd 1998, Satoh 2005). Bu üyeler, bir nörotransmitter ya da bir hormona yüksek derecede seçicilik gösterirler. ChE, butirilkolinesteraz ya da doku ve plazmada bulunan geniş çeşitlilikteki karboksilesterazlar gibi ailenin diğer üyeleri ise katalizleyecekleri substratlara daha az seçicilik gösterirler. Bu nedenle, diyet ya da maruz kalmanın başka yolları ile karşılaşıldığında yabancı substratlar için, bir koruyucu ve temizleme görevi yaparlar. Enzimlerin bu ailesi sentezlendikleri hücrelerde de büyük farklılıklar

göstermektedir. Bazıları çeşitli hücre tiplerinde bulunurken bazılarının yüksek selektif ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Satoh 2005). Vertebratlarda, farklı özgülüklere sahip ChE'lar serum ile bazı sinirsel ve sinirsel olmayan dokularda da bulunmaktadır (Talesa vd 1993b).

Karboksilesterazlar, piretroidler ve organofosfatları içeren birçok ksenobiyotığın ve endojenik bileşiklerin metabolizmasında önemlidirler. Karboksilesterazlar, bu bileşikleri daha az toksik metabolitlere hidrolize ederek piretroid toksisitesini redüklerler (Abernathy ve Casida 1973, Wheelock vd 2004, Wheelock vd 2005). Kolinesterazlar ise biyomonitoring programlarında kronik OP ve karbamat kirliliği tespitinde kullanılan (Weiss 1964, Dembélé vd 2000, Bakry vd 2001, Fulton vd 2001, Abdel-Halim vd 2006, Focardi vd 2006) kolin esterlerin ayrılmasını katalizleyen (Talesa vd 1996) ve asetil, propiyonik ve butirik esterleri hidrolize eden asetilkolinesteraz (AChE), propiyonilkolinesteraz (PChE) ya da butirilkolinesteraz (BChE) olarak sınıflandırılırlar (Talesa vd 1993b). Katalitik özelliklerine, inhibisyon özgülüklerine ve doku dağılımlarına göre sınıflandırılırlar (Marcel vd 1998). Akuatik türlerin ChE tiplerinin sınıflandırılması memeli ChE özelliklerine dayanan bir yaklaşımla substrat tercihlerine ve seçici inhibitörlere cevaplarına göre çalışılmıştır (Kousba vd 2003, Frasco vd 2006). Vertebratlarda ChE, katalitik özelliklerine, substrat özgülüklerine ve seçici inhibitörlere duyarlılıklarına göre asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ve pseudokolinesteraz ya da butirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) olarak iki gruba ayrılmaktadır (Marcel vd 1998, Chuiko 2000, Garcia vd 2000, Chuiko vd 2003, Rogríquez-Fuentes ve Gold-Bouchot 2004, Monteiro vd 2005, Focardi vd 2006, Frasco vd 2006). AChE substrat fazlalığı ile inhibisyona uğrarken BChE alifatik karboksilik asit monokolin esterlerinin düşük konsantrasyonlarında aktivasyon göstermektedir (Nachmanson ve Wilson 1951, Marcel vd 1998). ChE'lar substrat spesifliğinde geniş çeşitlilik gösterebilmektedirler. Örneğin göl alabalığı *Salvelinus namaycush*'ta AChE baskın durumdayken, yengeç *Uca pugmax*'ta BChE ve ördeklerde propiyonilkolin spesifik ChE'dır (Huggett vd 1992, Kristoff vd 2006). Diğer bir taraftan, farklı kaynaklardan ChE'lar moleküler formlarda farklı çözünürlükte ve membrandaki konumları bakımından geniş çeşitlilikte bulunabilmektedirler (Massoulié vd 1993, Kristoff vd 2006). ChE özelliklerinin türden türe farklılık göstermesi nedeni ile türlerin bir biyomarkör olarak kullanılabilirliği için öncelikli olarak türlerde bulunan enzimin tipinin karakterize edilmesi önemlidir. Ayrıca, birden fazla ChE bulunabilir ve bu

ChE'lar antikolinesteraz ajanlara farklı hassasiyetler gösterebilmektedirler (Kristoff vd 2006). *Drosophila melanogaster*'de glikolipid ankor yolu ile ampifilik dimer bağıyla membrana bağlı sadece bir ChE bulunurken nematod *Caenorhabditis elegans*'ta üç farklı gen substrat spesifiteleri farklı (Johnson ve Russell 1983, Johnson vd 1988) olan üç farklı AChE'ı kodlamaktadır (Johnson vd 1981, Marcel vd 1998). Ampifilik tetramer için kodlanan bu genlerden biri *in vitro* olarak klonlanmış ve ekspres edilmiştir (Arpagaus vd 1994, Marcel vd 1998). *Drosophila* ve nematod'daki bu iki enzim AChE olarak dikkate alınabilmektedir. Çünkü bunlar nörotransmitter asetilkolinin metabolize edildiği merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır. Vertebratlardan farklı olarak bu AChE'lar butiriltiyokolini etkili bir şekilde hidrolize edebilmektedirler (Johnson ve Russell 1983, Gnagey vd 1987, Marcel vd 1998).

1.1.1.1. Asetilkolinesteraz

Asetilkolin gibi asetil esterleri hidrolize eden enzimler asetilkolinesteraz (AChE, EC 3.1.1.7) ya da asetilkolin asetilhidrolaz olarak adlandırılırlar. Asetilkolinesteraz, asetilkolinin kolin ve asetata hidrolizini katalizlemesi (Kuhr ve Dorough 1976, Shi vd 2002, Lionetto vd 2003, Roex vd 2003, Cheng vd 2004, Wang vd 2004, Selkirk vd 2005, Yi vd 2006) ile sinir sisteminde nörotransmitter asetilkolinin işlevini sonlandırıcı anahtar bir role sahiptir (Massoulié vd 1993, Marcel 1998, Focardi vd 2006). AChE, invertebrat zararlıların kontrolü için kullanılan organofosfatlar (OP) ve karbamatlar gibi nörotoksik pestisitlerin primer hedefi olarak bildirilmiştir (Hassal 1990, Callaghan vd 2002, Frasco vd 2006). AChE inhibisyonu, direk olarak OP ve karbamat insektisitlerin toksik etki mekanizmaları ile bağlantılıdır (Ceron vd 1996, Lionetto vd 2003, Yi vd 2006) ve OP'lar ve karbamatlar gibi insektisitlere maruz kalan bireylerde AChE'in inhibisyonu sonucu normal sinir fonksiyonları bozulur (Habig ve DiGiulio 1991, Crane vd 2002). OP'lar nörotransmitter asetilkolini hidrolize eden AChE'in aktif bölgesine aktif okson metabolitleri ile (klorofiyrifos-okson, paraokson gibi) tersinmez bir şekilde bağlanmaktadır (Aldridge 1950, Aldridge ve Rainer 1972, Murphy 1986, Fukuto 1990, Rachinsky vd 1990, Habig ve DiGiulio 1991, Sussman vd 1991, Kardos ve Sultatos 2000, Callaghan vd 2001, Callaghan vd 2002, Sogorb ve Vilanova 2002, Cheng vd 2004, Kousba vd 2004, Wang vd 2004, Chandrasekara ve Pathiratne 2006). Eğer asetilkolin hidrolize edilmez ve postsinaptik membran üzerindeki reseptörden ayrılmazsa devam eden depolarizasyon meydana gelir ve paralizisi takiben ölümle

sonuçlanmaktadır (Hassal 1990, Callaghan vd 2001). OP'lar Fosfotriesterazlar ve CaE'larla oksidasyon ve hidroliz ile hidrolize edilirler (Sogorb ve Vilanova 2002). Karbamat insektisitler ise AChE'in tersinir inhibitörleridir (Reiner 1971, Kallander vd 1997). AChE'in inhibisyon prosesi karbamat insektisit ve asetilkolinin enzimin aktif bölgesindeki yüzey için yarışmaları ile ilişkilidir. Enzim-inhibitör kompleksi karbamat insektisit yapısındaki özelliklerine bağlıdır (Kolbezen vd 1954, Kallander vd 1997). Aktif bölgeye zayıf bağlanan karbamatlar kolayca aktif bölgeden ayrılarak enzimin geri aktivasyonunu sağlarlar (Matsumura 1985, Kallander vd 1997, Sogorb ve Vilanova 2002). Eğer karbamat insektisit aktif bölgeden ayrılmazsa karbamatın karbonil karbonu ester grubuna atak yapar ve stabil karbamillenmiş enzim kompleksi oluşur (Matsumura 1985, Kallander vd 1997). Karbamatlar, CaE'larca oksidasyon ve hidroliz ile hidrolize edilirler (Sogorb ve Vilanova 2002). Piretroidlerin etki mekanizmaları ise daha farklıdır. Piretroidler, Na⁺ kanallarına yüksek afinite gösterirler ve bu kanalların fonksiyonlarında toksik etki uyandırır. Piretroidlerle Na⁺ kanalları açılı kalır ve sinir membranının tamamlanmamış depolarizasyonuna neden olur. Oksidasyon ve detoksifikasyon ile detoksifiye edilirler ve CaE'larca hidrolize edilirler (Sogorb ve Vilanova 2002). OP insektisitlerden klorfiyrifos ve paratyon'un metabolik aktivasyonu, sitokrom P450 bağımlı oksidatif desülfürasyonla oluşan klorfiyrifos-okson ve paraokson ve sitokrom P450 bağımlı dearilasyonla detoksifikasyonu sonucu oluşan trikloropiridinol ve *p*-nitrofenol metabolitleri ile ilişkilidir (Sultatos ve Murphy 1983, McCracken vd 1993, Poet vd 2003, Kousba vd 2004). Desülfürasyon ve dearilasyon arasındaki denge çok farklı seviyelerde AChE inhibisyonu ile sonuçlanabilmektedir (Timchalk 2001, 2002, Kousba vd 2004). Malatyon gibi fosforoditiyoatlar ya da klorfiyrifos ve metil-paratyon gibi fosforotiyoatlar sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar (sülfoksidasyon) tarafından biyoaktif edilirler ve oluşan okson analogu daha potansiyel AChE inhibitörüdür (Chambers 1992). Nörotoksik bileşiklerce AChE inhibisyonu pestisitlere maruziyet ve bunların etkileri için bir biyomarkör (Thompson 1991, Crane vd 1995, Carr ve Chambers 1996, Scaps vd 1997, Dembélé vd 2000, Kirby vd 2000, Crane vd 2002, De la Torre vd 2002, Forget vd 2003, Frasco vd 2006) olarak doğada ve insanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Crane vd 1995, Kheir vd 2001). Özellikle balıklarda AChE aktivitesi inhibisyonu bir çok çalışmada OP ve karbamat pestisit maruziyetinin tespitinde kullanılmaktadır (Zinkl vd 1987, Galgani vd 1992, Beyers ve Sikoski 1994, Lionetto vd 2003). Çeşitli invertebratlarda da AChE aktivite ölçümleri OP maruziyetinin saptanmasında bir biyomarkör olarak

kullanılmıştır (Karnak ve Collins 1974, Detra ve Collins 1986, Day ve Scott 1990, Crane vd 1995, Ibrahim vd 1998, Sturm ve Hansen 1999, Callaghan vd 2001). Birçok biyomonitöring programında akuatik invertebratlar biyoindikatör organizmalar olarak kullanılmaktadır (Hyne ve Maher 2003, Kristoff vd 2006). Fakat bu türlerden özellikle kirlilik izleme programlarında sıklıkla kullanılan midyelerde (Day ve Scott 1990, Bocquené ve Galgani 1991, Ozretic ve Krajnovic-Ozretic 1992, Bocquené vd 1997, Basack vd 1998, Mora vd 1999, Doran vd 2001, Cooper ve Bidwell 2006) ve kabuklularda (Day ve Scott 1990, Lundebye vd 1997, Sturm ve Hansen 1999, Varó vd 2002) AChE inhibisyonunun bir biyomarkör olarak kullanılabilirliğine dair az çalışma bulunmaktadır (Lionetto vd 2003, Kristoff vd 2006). Pestisit bağlanması sonucu oluşan inhibisyonu saptamak için kullanılan AChE aktivite ölçümleri *Chironomus riparius*'u da içeren (Detra ve Collins 1991, Sturm ve Hansen 1999, Fisher vd 2000, Callaghan vd 2001, Olsen vd 2001, Crane vd 2002, Callaghan vd 2002) çeşitli invertebratlarda çalışılmıştır (Karnak ve Collins 1974, Day ve Scott 1990, Crane vd 1995, Ibrahim vd 1998, Callaghan vd 2002). Invertebratlar, BChE'ı tercihen sadece AChE'ı ekspres ediyorlar gibi görünmektedir fakat bu enzimler sık sık butirilkoline karşı önemli bir aktivite göstermektedirler (Toutant 1989, Selkirk vd 2005).

1.1.1.2. Butirilkolinesteraz

Butirilkolin gibi başka tip esterleri tercih eden enzimler ise butirilkolinesteraz (BChE, EC 3.1.1.8) ya da açilkolin açilhidrolaz olarak adlandırılmaktadırlar (Kristoff vd 2006, WEB_1). BChE pseudokolinesteraz, non-spesifik kolinesteraz ya da basit kolinesteraz olarakta bilinmektedir (Frasco vd 2006, Kristoff vd 2006, WEB_1). Butirilkolini ayrıcalıklı olarak hidrolize eden ve çözünebilir enzim, plazma (Massoulié vd 1993, Focardi vd 2006), karaciğer, akciğerler ve bağırsaklarda (Hugget vd 1992, Li vd 2000, Kristoff vd 2006) yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. BChE, butirilkolin gibi kolin esterler üzerine etki etmektedir (Sun vd 2002, Selkirk vd 2005). Asetilkolini hidrolize edebilmesine rağmen daha geniş substrat spesifikliğine sahiptir. Kokain gibi alkaloidleri içeren diğer esterler üzerine de etki etmektedir (Sun vd 2002, Selkirk vd 2005) ve bilinen spesifik doğal bir substratı bulunmamaktadır. BChE'in fonksiyonu hala tam bilinmemektedir (Silver 1974, Brestkin vd 1997, Marcel vd 1998, Chuiko vd 2003, Selkirk vd 2005). Genellikle ağızdan yutulan toksik bileşiklerin hidrolizinde koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir (Lockridge ve Masson 2000,

Selkirk vd 2005) ve kas ve sinir dokularında ChE aktivitesine katkıda bulunmaktadır (Massoulié vd 1993, Focardi vd 2006). BChE'in doğal bileşiklerin detoksifikasyonu ile ilgili olduğu belirtilmektedir (WEB_1).

1.2. Çeşitli İnvertebrat Türleri ile Yapılan ChE Çalışmaları

Farklı invertebratlarla yapılan çalışmalar, düşük seviyelerde OP maruziyetinde AChE inhibisyonuna bağlı ölümleri göstermiştir (Fulton ve Key 2001). Bu ise vertebratlara oranla invertebrat ChE'lerinin anti-kolinesteraz pestisitlere daha düşük duyarlılığa sahip olduğunu var saymaktadır. Hassasiyette tür-spesifik farklılıklar olabilmektedir. Bununla birlikte balık beyni gibi birçok ChE'in bulunduğu spesifik nörolojik doku preparasyonlarının yerine total-vücut homojenatlarının kullanıldığı invertebratlarda saptanan ChE seviyeleri duyarlılıktaki farklılıklara katkıda bulunmaktadır. Villatte vd (1998) birçok pestisit farklı türlerdeki duyarlılıklarını karşılaştırdıkları çalışmalarında böcek AChE olarak adlandırılan invertebrat ChE'lerinin vertebratlarınkine oranla inhibisyona daha duyarlı olduklarını bulmuşlardır (Frasco vd 2006).

Hindistan'da *Helicoverpa armigera* ve yaprak kurdu *Spodoptera letura*'da OP ve karbamat insektisitlere dirençlilik bildirilmiştir (Armes vd 1996, 1997, Kranthi vd 2001a, Srinivas vd 2004). Beyaz tütün sineği *Bemisia tabaci* (Dittrich vd 1985, 1990) ve *Heliothis virescens*'de de (Brown ve Bryson 1992) hassas olmayan AChE'in OP ve karbamat insektisitlere dirençlilik mekanizmasında ilişkili olduğu gösterilmiştir (Srinivas vd 2004). Benzer hassas olmayan AChE varyantları ev sineği, pamuk yaprak biti *Aphis gossypiella* (Moore vd 1988, 1989) ve birçok sivrisinek türü (Ffrench-Constant ve Bonning 1989) gibi zararlı böcek türlerinin heterojenik populasyonlarında bulunmuştur (Srinivas vd 2004). Dünyanın çeşitli bölgelerindeki *Helicoverpa armigera* populasyonlarında çeşitli dirençlilik mekanizmaları teşhis edilmiştir. Bunlar redüklenen penetrasyonu (Gunning vd 1991, Armes vd 1992, Kennaugh vd 1993, Kranthi vd 1997, 2001b), azalan sinir sensitivitesini (West ve McCaffery 1992) ve artan metabolizmayı (Ahmad ve McCaffery 1991) içermektedir (Srinivas vd 2004).

Bellanger vd (1998)'de invertebrat cephalopod *Sepia officinalis*'te AChE aktivitesini ve BChE ile PChE pseudo-ChE aktivitelerini ölçmüşlerdir. Aktivite ölçümlerini 0,3 mM ATC, 1 mM BTC ve 0,3 mM PTC substrat son konsantrasyonları

ile 1,5 mM DTNB ve 20 mM fosfat tamponu pH 7 içeren reaksiyon ortamında beyin homojenatı kullanarak yapmışlardır. Farklı beyin bölümlerinde ölçülen aktivitelerde, AChE için 13,4-75,9 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein, BChE için 4-38 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein ve PChE için 11,1-50,8 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein olarak saptamışlardır. Talesa vd (1993a) ve Scaps vd (1996)'da da belirtildiği gibi ChE aktiviteleri AChE>PChE>BChE şeklinde bulunmuştur.

Marcel vd (1998), *Drosophila melanogaster* ve nematod *Caenorhabditis elegans* AChE kinetik davranışlarını 1 μM ile 200 mM arasında değişen substrat (asetiltiyokolin, butiriltiyokolin, propiyoniltiyokolin, asetil- β -metiltiyokolin ve *o*-nitrofenil asetat) konsantrasyonlarında çalışmışlardır. *Drosophila* ve nematod AChE'ları ile substratların hidrolizini 1 ile 100 μM arasında vertebrat AChE için kurulan kinetik modelden farklı bulmuşlardır. *Drosophila* ve nematod AChE'ları tiyokolin esterlerin hidrolizi için trifazik kinetik göstermiştir. *Drosophila*'da asetiltiyokolin, butiriltiyokolin, propiyoniltiyokolin, asetil- β -metiltiyokolin ve *o*-nitrofenil asetat için K_{m1} ve K_{m2} değerleri sırasıyla 2,95-84; 26-273; 6,8-441; 8,5-66 ve 61-3485 μM olarak bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada, *Liposcelis bostrychophila* ve *Liposcelis entomophila* böceklerini altı farklı konsantrasyonda paraokson ve karbosulfan'a maruz bırakmışlar ve *in vitro* CaE ile AChE inhibisyon kinetiklerini çalışmışlardır. İki türün AChE aktivitelerini oldukça yakından ilişkili bulmuşlardır. ATC substratı ve 0,1 M fosfat tamponu pH 8,0 kullanılarak 37 °C'de 30 dak inkübasyon sonrası 412 nm'de 5 dak süresince takip edilen AChE aktivitelerinde iki canlı için sırasıyla K_m 0,24 ve 0,23 mM, V_{max} ise 0,17 ve 0,16 Optik yoğunluk/mg protein/30 dak bulmuşlardır. ATC substratı için 15 μM 'dan 6 mM'a kadar 5 farklı konsantrasyon denenmiş ve 1×10^{-9} M ile 1×10^{-6} M arasındaki farklı konsantrasyonlarda paraokson ve karbosulfan'ın inhibisyonu çalışılmıştır (Cheng vd 2004). Benzer bir çalışmada ise yine *L. bostrychophila* ve *L. entomophila* böceklerini altı farklı konsantrasyonda diklorvos'a maruz bırakmışlar ve CaE ile AChE inhibisyon kinetiklerini çalışmışlardır. 1,5 mM ATC substratı, 1 mM DTNB ve 0,1 M fosfat tamponu pH 8,0 kullanılarak 37 °C'de 30 dak inkübasyon sonrası 412 nm'de 5 dak süresince takip edilen AChE aktivitelerinde iki canlı için sırasıyla K_m 0,24 ve 0,23 mM, V_{max} ise 0,17 ve 0,16 Optik yoğunluk/mg protein/30 dak bulmuşlardır. 15 μM 'dan 6 mM'a kadar 5 farklı konsantrasyonda ATC substratı için

1×10^{-9} M ile 1×10^{-6} M arasındaki farklı konsantrasyonlarda diklorvos'un inhibisyonunu çalışmışlardır. *L. bostrychophila* CaE aktivitesi *L. entomophila*'ya oranla daha duyarlı, diklorvos'a maruz bırakılan *L. bostrychophila* (325 nM) bireylerinde AChE aktivitesi, *L. entomophila* (612 nM) bireyelerine oranla 5,8 kat daha hassas bulunmuştur (Wang vd 2004).

Kristoff vd (2006) yaptığı çalışmada, gastropod *Biophalaria glabrata* ve oligoket *Lumbriculus variegatus* bireylerinde ChE karakterizasyonu ve OP pestisit azinfos-metil ile indüklenen ChE aktivitesi inhibisyonun derecesi ile bazı biyokimyasal özellikleri çalışmışlardır. Salyangozları 0,05; 0,5; 2,5; 5; 10 ve 15 mg/lt, kurtlar ise 0,001; 0,004; 0,005; 0,006; 0,0075; 0,01 ve 0,25 mg/lt pestisit konsantrasyonlarına maruz bırakmışlar ve ChE inhibisyonunu araştırmışlardır. Reaksiyon ortamına 100 mM fosfat tamponu pH 8; 0,2 mM DTNB ve 0,75 mM ATC/1,5 mM BTC eklenmiştir. Her iki canlıda da yüksek enzimatik aktivite ATC substratında gözlenmiştir. *Biophalaria glabrata*'da ATC substratı ile supernatant ve pelet fraksiyonlarında yüksek aktivite gözlenirken BTC substratı ile her iki fraksiyonda da oldukça düşük aktivite gözlenmiştir. *Lumbriculus variegatus*'ta ise *Biophalaria glabrata*'ya oranla her iki substratla iki fraksiyonda (ATC substratı ile supernatantta 6, pelette 20 kat yüksek ChE aktivitesi) da daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Sonuç olarak iki invertebrat türü arasında enzim tipi, subelular lokasyonu ve ChE aktiviteleri bakımından farklılıklar bulunmuştur. İki invertebrat türünde de 24 ve 48 sa'lik *in vivo* azinfos-metil maruziyetinde ChE inhibisyonu gözlenmiştir. 72 ve 96 sa'lik maruziyetlerde ise 48 sa'lik maruziyetteki inhibisyona oranla anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Azinfos-metil dirençli elma güvesi *Cydia pomonella* (L.) ile yapılan çalışmada aldikarb, pirimikarb, dekametonyum, edrofonyum ve d-tubokunarin gibi AChE inhibitörleri potasyum fosfat tamponunda çözülerek, karbaril, paraokson, klorfiyrifos-okson ve azinfos-metil-okson ise etanolde çözülerek enzim homojenatını, fosfat tamponu ve DTNB içeren karışım ile 4 °C'de 20 dak inkübe etmişler ve ATC, PTC ve BTC substratlarının ilavesi ile enzimatik reaksiyonu takip etmişlerdir. Azinfos-metil'e dirençli ve hassas türlerle yapılan çalışmada, ATC substratı için hassas bireylerde K_m 0,5 mM, V_{max} 159,8; dirençli bireylerde ise K_m 0,9 mM, V_{max} 106; PTC substratı için hassas bireylerde K_m 0,9 mM, V_{max} 136,6; dirençli bireylerde ise K_m 1,3, V_{max} 79,9 olarak bulunmuştur. ATC ve PTC substratları için azinfos-metil'e dirençli türlerde K_m

ve V_{max} değerleri hassas türlere oranla daha yüksek bulunmuş buda dirençli böceklerde AChE'in substratına daha düşük afinitesi olduğunu göstermiştir. AChE aktivitesi 10 mM'ın üzerindeki substrat konsantrasyonunda ATC substratı ile inhibisyona uğrarken PTC substratı ile bir inhibisyon gözlenmemişlerdir. BTC substratı ise elma güvesi AChE'ı ile güçlükle hidrolize olmuştur. OP dirençli ve hassas türlerde çeşitli inhibitörlerle inhibisyonda bir farklılık gözlenmemiştir. Hassas ve dirençli bireyler için ki değerleri sırasıyla, klorfiyrifos için $2,5-3,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, azinfos-metil-okson için $1,4-2,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, paraokson için $7,7-8,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, karbaril için $37-40 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, primikarb için $2,3-4,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, aldikarb için $45-36 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, edrofonyum için $5,5-4,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dekametonyum için $38-38 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ve d-tubokunarin için $450-480 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bulunmuştur. Tüm inhibitörlerde kompetatif inhibisyon gözlendiği bildirilmiştir (Reuveny ve Cohen 2004).

Rao vd (2003) yaptığı çalışmada toprak solucanı *Eisenia foetida* 24 ve 48 sa 0,0158; 0,0317; 0,0476; 0,0634 ve 0,0793 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ konsantrasyonlarında klorfiyrifos'a maruz bırakılmış ve AChE aktiviteleri saptanmıştır. Klorfiyrifos'un konsantrasyon bağımlı olduğu ve artan pestisit konsantrasyonlarında hayatta kalan yüzdesinin azaldığı görülmüştür. AChE aktivitesi 12, 24, 36 ve 48 sa maruziyette sırasıyla %60, %79, %85 ve %91 artan inhibisyon gözlenmiştir. Ayrıca *Eisenia foetida*'da K_m ATC substratı ile 0,228 mM ve V_{max} 0,025 olarak bulunmuştur. Klorfiyrifos ile inhibisyonda kompetatif inhibisyon gözlenmiştir.

Palaemon serratus gözlerinden elde edilen saflaştırılmış numunelerin ChE aktiviteleri için enzim kaynağı olarak kullanıldığı çalışmada ATC, PTC, BTC ve A β MTC substratları kullanılarak karbamat ve OP pestisitlerin (klorfiyrifos-okson, triazofus-okson, paraokson-metil, paraokson-etil, diklorvos, malaokson, eserinsülfat, karbofuran, propoksür ve karbaril) *in vitro* inhibisyonlarını çalışmışlardır. ChE aktivitesinin, ATC>A β MTC>PTC olduğunu, BTC'nin ise hidrolize edilmediğini ve ATC ile A β MTC'de yüksek konsantrasyonlarda enzimatik inhibisyon gözlendiğini bildirmişlerdir (Frasco vd 2006).

Srinivas vd (2004) yaptığı çalışmada, tarla ürünlerinden toplanan güve larvalarının (*Helicoverpa armigera*) sipermetrin, fenvalerat, endosulfan, monokrotofos ve kuinolfofos'a dirençliliklerini test etmişlerdir. Hassas böceklerin %99'unu öldürecek pestisit dozlarına maruz bırakılan larvalarda hayatta kalan dirençli soylar saptanmış ve

hayatta kalanların yüksek mevsimsel averaj yüzdeleri piretroid insektisit fenvalerat'ta %65 ve sipermetrin'de %62,4 olarak kaydedilmiştir. Dirençli larvalarda AChE monokrotofos ve metil-paraokson'da daha duyarlı bulunmuştur. Ayrıca ölçülen esteraz, fosfataz ve paraokson hidrolaz aktiviteleri hassas soylara oranla dirençli soylarda daha yüksek bulunmuştur.

Kırmızı bataklık kereviti *Procambarus clarkii* ile yapılan bir çalışmada canlının yaşam alanını pestisit fenitrotiyon ile muamele edilmiş ve muamele öncesi AChE aktivitesi $9,4 \text{ nmol dak}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak bulunurken muamele sonrası $4,2 \text{ nmol dak}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein bulunmuş ve AChE inhibisyonu gözlenmiştir. Sonuç olarak AChE'in pestisit maruziyeti için bir biyomarkör olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Porte ve Escartin 1997).

0,17; 0,61; 95 $\mu\text{g/l}$ ve 6,2; 2,9; 27 $\mu\text{g/l}$ diklorvos, paratiyon ve aldikarb'a maruz bırakılan *Daphnia magna* ve *Chironomus riparius* bireyleri ile yapılan çalışmada da kontrollere oranla ChE inhibisyonu saptamışlardır. *Daphnia magna* ve *Chironomus riparius* ile yapılan 24 saatlik akut çalışmalarda anti-ChE bileşiklerin (diklorvos, paratiyon ve aldikarb) ChE aktivitesini doz-bağımlı bir şekilde azalttığı bildirilmiştir. EC_{50} değerleri *Daphnia magna* için paratiyon'da %98,9, diklorvos'ta %75,5, aldikarb'da %77,9 bulunurken *Chironomus riparius* için paratiyon'da %84, diklorvos'ta %77-83, aldikarb'da %53 bulunmuştur (Sturm ve Hansen 1999). Belden ve Lydy (2001) yaptığı çalışmada, *Chironomus tentans* larvalarını OP insektisit klorfiyirifos ile herbisit atrazin'e ve bunların kombinasyonuna maruz bırakmışlardır. Atrazin tek başına AChE aktivitesini redüklemekle atrazin-klorfiyirifos kombinasyonunda yalnız klorfiyirifos'a maruz bırakılanlara oranla daha yüksek inhibisyon gözlemişlerdir. Benzer sonuçların elde edildiği malatiyon ve metil-paratiyon için istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır. Kheir vd (2001) ise *Chironomus riparius* bireylerini permetrin, çinko, pirimifos-metil ve lindan'a maruz bırakmışlar, 24 sa ve 48 sa'lik pirimifos-metil maruziyetinde AChE inhibisyonu gözlerken permetrin ve çinko'ya maruz bırakılanlarda bir etki saptamamışlardır. 24 ve 48 sa'lik bireylerde 1 ve 5 $\mu\text{g/g}$ pirimifos-metil konsantrasyonlarında yüksek AChE inhibisyonu gözlemişlerdir. Detra ve Collins (1991) ve Ibrahim vd (1998)'e göre OP'lar AChE inhibitörüdür ve *C. riparius*'ta kolinesteraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Ayrıca 24 sa lindan'a maruz bırakılan larvalarda AChE aktivitesinde önemli farklılıklar

bulunmuştur. Fakat lindan'ın spesifik bir kolinesteraz inhibitörü olmaması nedeniyle inhibisyon monotonik bulunmamış ve 5 µg/g'lık yüksek konsantrasyonda anlamlı bir inhibisyon gözlenmemiştir. 48 ve 96 saat 0, 5, 10 ve 50 ng/g OP insektisit primifos-metil'e maruz bırakılan *Chironomus riparius* larvalarından, 50 ng/g insektisite maruz bırakılan larvalar 48 sa içinde ölmüş ve farklı konsantrasyonlarda primifos-metil'e maruz bırakılan bireylerde AChE aktivitelerinde yüksek derecede anlamlı farklılık bulunmuşlardır. 10 ng/g insektisite maruz bırakılan larvalarda AChE aktivitesi redüklenmiştir (Crane vd 2002). Callaghan vd (2002) yaptığı çalışmada yine 48, 72 ve 96 sa süreyle 3, 12 ve 22 °C'de 0; 0,1; 1 ve 10 µg/lt primifos-metil'e maruz bırakılan *Chironomus riparius* larvalarında AChE ile GST aktivitelerini ölçmüşlerdir. Maruziyet süresi, sıcaklık ve pestisit konsantrasyonları arasında anlamlı bir etkileşim bulunmuştur. Kontrol ve 0,1 µg/lt primifos-metil'e maruz bırakılan bireylerde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

İki hafta süresince farklı konsantrasyonlarda diazinon'a maruz bırakılan Isopod *Porcellio scaber* ile yapılan çalışmada, AChE aktivitesinin juvenil bireylerde 5 µg/g diazinonda inhibe olduğu, yetişkin bireylerde ise 50 µg/g değerinin altındaki diazinon konsantrasyonunda inhibisyona uğramadığı bulunmuştur. İki haftalık maruziyet sonucunda 100 µg/g diazinon konsantrasyonunda enzim aktivitesi ve protein içeriği redüklenmiş ve artan ölüm gözlenmiştir (Stanek vd 2006).

Yi vd (2006) yaptığı çalışmada, erkek ve dişi *Carassius auratus* bireyleri metomil, tiyodikarb, karbofuran ve karbosulfan insektisitlerine maruz bırakılarak AChE inhibitör etkilerini çalışmışlardır. *ki* değerleri metomil, tiyodikarb, karbofuran ve karbosulfan için sırasıyla 1,03; 2,44; 1,03 ve 1,106 olarak bulunmuştur. Sadece karbosulfan için AChE dekarbamilasyon hızı erkek bireylere oranla dişilerde anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Buna göre dişilerde karbosulfan tarafından AChE inhibisyonu erkek balıklara oranla daha hızlı giderilebilmektedir. Sonuç olarak dişilerde karbamatlara karşı AChE hassasiyeti erkek balıklara oranla oldukça farklı bulunmuştur.

Sturm vd (1999), Cajaraville vd (2000) ve De la Torre (2002) yaptığı çalışmalarda, balıklarda AChE'in deniz ve tatlı su ekosistemlerinin insektisitlerce kontaminasyonun izlenmesinde yararlı olduğu bulunmuştur (Yi vd 2006). Farklı balık türlerinde AChE'in OP'lara spesifik aktivitesi ve sensitivitesinin çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır (Li ve Fan 1996, Chuiko 2000, Chuiko vd 2003, Eder vd 2004, Silva Filho vd 2004, Yi vd

2006). Wheelock vd (2005) yaptığı bir çalışmada, AChE aktivitesi OP ve karbamat maruziyetinde bir biyomarkör olarak izlenmiştir. Şinuk som balığı *Oncorhynchus tshawytscha* juvenil bireyler klorfiyirifos ve esfenvalerat'a maruz bırakılmış ve CaE, AChE ativiteleri ile CYP1A protein seviyeleri ölçülmüştür. AChE aktivite ölçümlerinde 0,32 mM DTNB ve 2 mM ATC son konsantrasyonları kullanılmıştır. 7,3 µg/lt klorfiyirifos'a maruz bırakılan bireylerde beyin ve kas dokusunda %85 ve %90 AChE inhibisyonu saptanırken esfenvalerat'ta hiçbir etki bulunmamıştır.

Kousba vd (2004) yaptığı çalışmada, erkek Sprague-Dawley ratlarında klorfiyirifos-okson ve paraokson'un inhibisyon dinamiklerini çalışmışlardır. Elde edilen beyin fraksiyonları %50 inhibitör konsantrasyonları üzerinden klorfiyirifos-okson ve paraokson ile inkübe edilmiş 1 pM klorfiyirifos-okson ve paraokson konsantrasyonlarında total beyin AChE aktivitesi 3-4 sa inkübasyon sonucu sırasıyla %30 ve %40 inhibisyon gözlenmiştir. Rat beyin AChE aktivitesi yüksek okson konsantrasyonu ile inkübasyonda klorfiyirifos-okson, paraokson'dan daha *in vitro* inhibisyon göstermiştir. Düşük okson konsantrasyonlarında klorfiyirifos-okson ve paraokson için *ki* değerleri nM okson konsantrasyonları ile inkübasyonda elde edilen değerlere oranla 10-15 kat farklılık gösterdiği bulunmuştur. AChE inhibisyonunun OP bileşiklerin toksisitesinin bir göstergesi olduğuna dair yapılan bir çalışmada, denek hayvanları rat, tavşan, mice ve insan olmayan primatlar kullanılarak soman, siklosarin, tabun, paraokson gibi OP bileşiklerin *in vivo* letal etkileri ve inhibisyon varyasyonları çalışılmıştır. Çalışılan canlılar arasında AChE inhibisyon düzeylerinde farklılıklar bulunmuş fakat bunun başka mekanizmalardan kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Maxwell vd 2006).

Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda organofosfatlı ve karbamatlı insektisitlerin ChE aktivitelerini yüksek seviyelerde inhibe ettiği ve uygun biyomarkör organizmaların kullanımı ile ChE aktivitelerinin, akutik alanların pestisitlerce kontaminasyonunun tesbitinde bir biyomarkör olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir.

1.3. Sitokrom P450 ve CYP1A1

Artan çevre kirliliği ile birlikte, çevresel kirleticilerin tüm canlı organizmalarda bulunan sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar tarafından metabolize edilmesi ile ilgili çalışmalar büyük önem kazanmıştır. Sitokrom P450 monooksijenazlar; ilaçlar,

çevresel kirleticileri içeren kimyasallar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi karsinojenler ve pestisitler gibi ekzojenik maddelerin metabolizmasında ilgili olan bir hemprotein süper ailesidir (Nelson vd 1996, Crampton vd 1999, Bylund vd 2001, Cui ve Strobel 2002, Ranson vd 2002). Çoğunlukla toksik bileşiklerin detoksifikasyonunu başlatan Sitokrom P450, yapısal olarak farklı organik ksenobiyotiklerin metabolizmasında ana rol oynamaktadır (DiGuiulio vd 1995, Sturm ve Hansen 1999). Mikrozomal monooksijenazlara bağlı sitokrom P450'ler ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili en önemli enzim sistemi olarak gösterilmektedir ve çeşitli çevresel kirleticilere maruz kalan bireylerde spesifik P450 izozimleri artmaktadır (Scott 1999, Londoño vd 2004).

Böcek P450'leri hormonlar, yağ asitleri ve steroidler gibi endojenik bileşiklerin seviyelerinin düzenlenmesinde olduğu kadar pestisitler gibi ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda da önemlidirler (Scott 1999, Londoño vd 2004). P450 enzimleri böcek büyümesi, gelişimi ve üremesinde önemli olan juvenil hormonların ve steroidlerin biosentetik yollarında da bulunmaktadır (Feyereisen 1999, Londoño vd 2004). Bu enzimlerle katalize edilen başlıca reaksiyonlar; alifatik ve aromatik hidroksilasyon, epoksidasyon, N-,S-,O- dealkilasyon, eliminasyon ve deaminasyondur (Hodgson vd 1993).

Sitokrom P450 monooksijenazları içeren Karışık-fonksiyonlu oksidazlar (MFO) OP ve piretroidler ile birbirini etkileyen bir enzim süperailisini kapsamaktadır (Poet vd 2003, Casida ve Quistad 2004, Wheelock vd 2005). OP'lar, balıkta kirlilik biyomarkör enzimi olarak kullanılan CYP1A'yı içeren CYP aktivitesini de baskılamaktadırlar (Flammarion vd 1998, Wheelock vd 2005). Organofosfatlara karşı, piretroidlerin metabolizması bir detoksifikasyon prosesidir (Casida ve Quistad 1995, Wheelock vd 2005). Artan CYP aktivitesi böceklerin piretroidlere dirençliliğinde önemli bir mekanizmadır (Scott 1999). Malatyon gibi fosforoditiyoat'lar ya da klorfiyrifos ve metil-paratyon gibi fosforotiyoat'lar sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar (sülfoksidasyon) tarafından biyoaktive edilirler ve oluşan okson analogu daha potansiyel AChE inhibitörüdür (Chambers 1992). Yükselen CYP aktivitesi böceklerin esfenvalerat'ı içeren piretroidlere dirençlilik mekanizmasında önemlidir (Scott 1999, Wheelock vd 2005). CYP'leri baskıladıkları bildirilen OP'lardan farklı olarak

esfenvalerat'ı da içeren piretroidlerin bazı CYP izoformlarını değiştirmeleri gibi çeşitli etkileri bulunmaktadır (Barry vd 1995, Wheelock vd 2005).

Sitokrom P450'ler arasında sitokrom P4501A biyoaktivasyonda önemli rol oynar. Balıklarda sitokrom P4501A proteini karsinojenlerin biyoaktivasyonu ve metabolizmasındaki rollerinden (Gelboin 1980, Conney 1982, Stegeman 1995), çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyellerinden (Payne vd 1987, Goksoyr ve Förlin 1992, Arınç vd 2000) dolayı oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır. 3-MC, B(a)P, TCDD, PCB, PAH ve diğer halojenli bileşikler sitokrom P4501A1'in güçlü indükleyicileri olarak bilinmektedir (Kırıkbakan 2004). Fakat böcek sitokrom P450'leri katalizledikleri reaksiyonlar ve reaksiyonların model indükleyicileri bakımından vertebratlardaki benzerlerinden farklıdırlar. Vertebrat P4501 indükleyicisi, böceklerde etkili değildir. Fakat birçok memeli P450 II ve IV geni indükleyicisi böcek P450'lerini de indüklemektedir (Ronis ve Hodgson 1989, Sturm ve Hansen 1999).

Pestisitler ya da PAH'lar gibi ksenobiyotiklere maruz bırakılan çeşitli canlılarla yapılan çalışmalarda sitokrom P450 konsantrasyonlarında ve EROD aktivitelerinde indüksiyon gözlenmiştir. Örneğin, yiyecekleriyle benzo(a)piren ya da poliklorlubifeniller'e maruz bırakılan poliket *Nereis virens*'lerde sitokrom P450 konsantrasyonlarında kontrollere oranla 2 kat artış gözlenmiştir (Lee 1981). Benzer şekilde, petrolle ikinci derece kirletilmiş *N. virens*'lerde etoksirezorufin *O*-deetilaz aktivitesi çalışılmış ve referans kurtlara oranla yüksek aktivite bulunmuştur (Reily vd 1992). Kırmızı bataklık kereviti *Procambarus clarkii* ile yapılan bir çalışmada, alan pestisit fenitrotiyon ile muamele edilmiş muamele öncesi EROD aktivitesi $0,68 \pm 0,58$ pmol dak⁻¹ mg⁻¹ protein olarak saptanırken muamele sonrası $2,73 \pm 2,63$ pmol dak⁻¹ mg⁻¹ protein olarak saptanmıştır (Porte ve Escartin 1997). Yine başka bir çalışmada, *Daphnia magna* ve *Chironomus riparius* bireyleri sırayla 0,17; 0,61; 95 µg/lt ve 6,2; 2,9; 27 µg/lt dichlorvos, parathion ve aldikarb'a maruz bırakılmış bireylerde EROD, MROD ve ECOD aktiviteleri *Daphnia magna*'da saptanamazken *C. riparius* bireylerinde kontrollere oranla EROD, MROD ve ECOD aktiviteleri saptanmıştır. Paratiyon'un sitokrom P450 bağımlı enzimler üzerine bir etkisi saptanamamıştır (Sturm ve Hansen 1999). *Chironomus riparius* bireylerinde sitokrom P450 aktivitesinin etoksirezorufin-*O*-deetilaz (EROD) kullanılarak ölçüldüğü başka bir çalışmada ise larvalar fenobarbitol (0,5 ve 1,0 mM) ve permetrin'e (1 ve 10 µg/g) maruz bırakılmış

ve her iki kimyasalında *C. riparius* larvalarında EROD aktivitesini indüklediği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, *C. riparius* bireylerinde EROD aktivitesinin tatlı su kirliliğinin belirlenmesinde uygun biyomarkörlerin eklenmesi ile tespit edilebileceğini göstermiştir (Fisher vd 2003).

Achazi vd (1998) yaptığı çalışmada, *Eisenia fetida* ve *Enchytraeus crypticus* sitokrom P450 monooksijenaz aktiviteleri etoksi-, pentoksi- ve benzoksirezorufin substratları kullanılarak analiz edilmiştir. *E. fetida* pentoksirezorufin aktivitesi 0,26-1,05 pmol/dak/mg protein, benzoksirezorufin aktivitesi ise 0,14-0,30 pmol/dak/mg protein olarak ölçülmüştür. 4 hafta süresince 100 mg floranten ve benzo[a]piren (BaP)'e maruz bırakılan canlılarda monooksijenaz aktivitelerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. *E. crypticus* EROD aktivitesi ise 2,10-6,18 pmol/dak/mg protein, pentoksirezorufin aktivitesi ise 1,75-4,78 pmol/dak/mg protein olarak ölçülmüştür. BaP maruziyetinde EROD aktivitesinde %45 indüksiyon gözlenirken pentoksirezorufin aktivitesinde gözlenmemiştir. Safılaştırılmış mikrozomal proteinlerle yapılan SDS-PAGE ve (*Perca fluviatilis*) CYP1A antikoru kullanılarak yapılan immunokimyasal analizlerde sinyal gözlenmiştir. Wheelock vd (2005) yaptığı bir çalışmada, AChE aktivitesi OP ve karbamat maruziyetinde bir biyomarkör olarak izlenmiş, som balığı *Oncorhynchus tshawytscha* juvenil bireyler klorfiyrifos ve esfenvalerat'a maruz bırakılmış ve CaE, AChE ativiteleri ve CYP1A protein seviyeleri ölçülmüştür. CYP1A protein seviyelerinde yüksek dozda klorfiyrifos'ta %30 artış görülürken esfenvalerat'ta bir etki saptanmamıştır.

Sonuç olarak, yapılan çalışmalarda sitokrom P450 bağımlı monooksijenazların invertebratlarda organofosfatlı ve piretroidli insektisitlere dirençlilikte rol oynadığı ve bu ksenobiyotiklere maruz kalan bireylerde sitokrom P450 indüksiyonun gözleendiği bildirilmiştir. Ayrıca CYP1A1 indükleyicisi PCB gibi ksenobiyotiklere maruz kalan bireylerde saptanan EROD aktivitelerinde de artış gözleendiği bildirilmiştir.

1.4. Çalışmanın Amacı

Çalışmalarımızda kullanılan *Limnodrilus profundicola* oligoketleri, tatlı sularda, sediment içinde, başları çamura gömülü olarak yaşayan ve sediment üzerinden beslenen, bu nedenle burada biriken kirleticilere maruz kalan, kirliliğe duyarsız olmayan ama direnç kazanabilen kozmopolit bir türdür. Birçok akuatik canlının önemli

besin kaynaklarından biridir. Sediment içinde yaşama yeteneği, onları sedimentten adsorblayabileceği toksikantlar için iyi birer biyolojik indikatör kılar ve sularda organik kirliliğin tespitinde kullanılan bir biyoindikatör organizmadır (WEB_2).

Çalışmalarımızda kullanılan *L. profundicola* oligoketleri, Denizli ili sınırları içerisinde kalan Büyük Menderes Nehri'nin önemli bir kolu olan Çürüksu Çayı'ndan toplanmıştır. Özellikle endüstriyel ve tarımsal kirleticilere maruziyet yönünden organik kirlilik derecesine ve canlıların ortamda bulunurluklarına göre üç farklı istasyon belirlenmiştir. En az kirlilik derecesine sahip olduğu düşünülen Sığma istasyonundan toplanan *L. profundicola* bireylerinde sitozolik kolinesteraz aktivitesi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen optimum pH, sıcaklık, protein ve substrat konsantrasyonları kullanılarak ChE aktivitesi üzerine *in vitro* paraokson-metil (bir OP isektisit olan metil-paratyon'un okson metaboliti) inhibisyonu çalışılmıştır. Güzelköy, Korucuk ve Sığma istasyonlarından toplanan *L. profundicola* bireylerinde sitozolik ChE aktiviteleri ve mikrozomal EROD aktiviteleri sırasıyla spektrofotometrik ve florometrik olarak tespit edilmiştir. Korucuk istasyonundan toplanan canlılar laboratuvar ortamında deltametrin, metil-paratyon ve metomil insektisitleri ile petrol rafinerisinden temin edilen atık çamur ve atık su ile muamele edilmiş ve maruziyet sonunda sitozolik ChE ve mikrozomal EROD aktivite değişimleri tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ve Western blot analizleri ile *L. profundicola* oligoketlerinde CYP1A1 ve CYP4A varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışmalarımızda *L. profundicola* oligoketlerinde sitozolik ChE aktivitesi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak karakterizasyonu yapılmış ve *L. profundicola* oliketlerinde ChE ve EROD aktivitelerinin tatlı su kirliliğinin izlenmesinde bir biyomarkör olarak kullanılabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Materyaller

2.1.1. Deney hayvanı

Limnodrilus profundicola Annelida filumunun Oligochaeta alt sınıfına aittir. *L. profundicola*'nın sistematığı ve genel görünüşü Tablo 2.1 ve Şekil 2.1'de verilmiştir.

Tatlı sularda, sediment içinde başları çamura gömülü olarak yaşayan ve sediment üzerinden beslenen, bu nedenle substratla maksimum kontağı kuran endobentik bir türdür (Egeler vd 1999). Tüm maruziyet yolları bu organizmalarda biyoakümülyasyona neden olur (Reynoldson vd 1987, Egeler vd 1999).

Tablo 2.1 *Limnodrilus profundicola*'nın sistematığı

Süperalem	: Eucaryota
Alem	: Animalia
Filum	: Annelida
Sınıf	: Clitellata
Alt sınıf	: Oligochaeta
Takım	: Haplotaxida
Alttakım	: Tubificina
Aile	: Tubificidae
Cins	: <i>Limnodrilus</i>
Tür	: <i>Limnodrilus profundicola</i> (Verril, 1871)
Yayılış	: Özellikle III ve IV. Kalite Tatlı Sular

Kirliliğe duysız olmayan ama dirençlilik kazanabilen kozmopolit bir türdür. Hem temiz hem de oldukça kirli sularda bulunur. Genellikle, kirletilmiş bir ortamdan son olarak elenir ve geniş çeşitlilikteki çevresel koşullara adapte olabilir. Ekolojik çalışmalarda test organizma ve kirlilik biyoindikatörü olarak sıklıkla kullanılır

(WEB_2). Ayrıca bu kozmopolitan akuatik oligoketler laboratuarda kolaylıkla kültürlerinin yapılması ile bilinmektedirler (Kennedy 1966, Kosiorek 1974, Reynoldson vd 1991, Egeler vd 1999).



Şekil 2.1 *Limnodrilus profundicola*

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

Akrilamit (A-3553), ϵ -amino kaproik asit (ϵ -ACA; A-2504), amonyum persülfat (APS; A-3678), asetil tiyokolin klorit (ATC; A-5626), 5-bromo-4-kloro-3-indol fosfat (BCIP; B-6149), sığır serum albumin (BSA; A7906), butile hidroksi toluen (BHT; B-1378), butiril tiyokolin klorit (BTC; B-3128), brom fenol mavisi (B-0126), 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamino]-1-propan-sülfat (CHAPS; C-3023), kolik asit (C-1254), deoksikolik asit (D-6750), 5, 5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (3, 3'-6) (DTNB; D-8130), etilen diamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA; E-5134), Folin reaktifi (F-9252), glisin (G-7126), Brij 35 (P-1254), N, N'-metilen bis-akrilamid (BIS; M-7256), β -nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (β -NADPH; N-7505), nitro blue tetrazolyum (NBT; N-6876), fenil metan sülfonil florid (PMSF; P- 7626), propiyonil tiyokolin klorit (PTC; P-2755), sodyum potasyum tartarat (S-2377), tris (T-1378), polietilen sorbiton monolaurat (Tween 20; P-1379), N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED; T-8133), Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA)'den elde edilmiştir. Alüminyum klorür (06230), bakır (II) klorür (12826), bakır sülfat pentahidrat (61240),

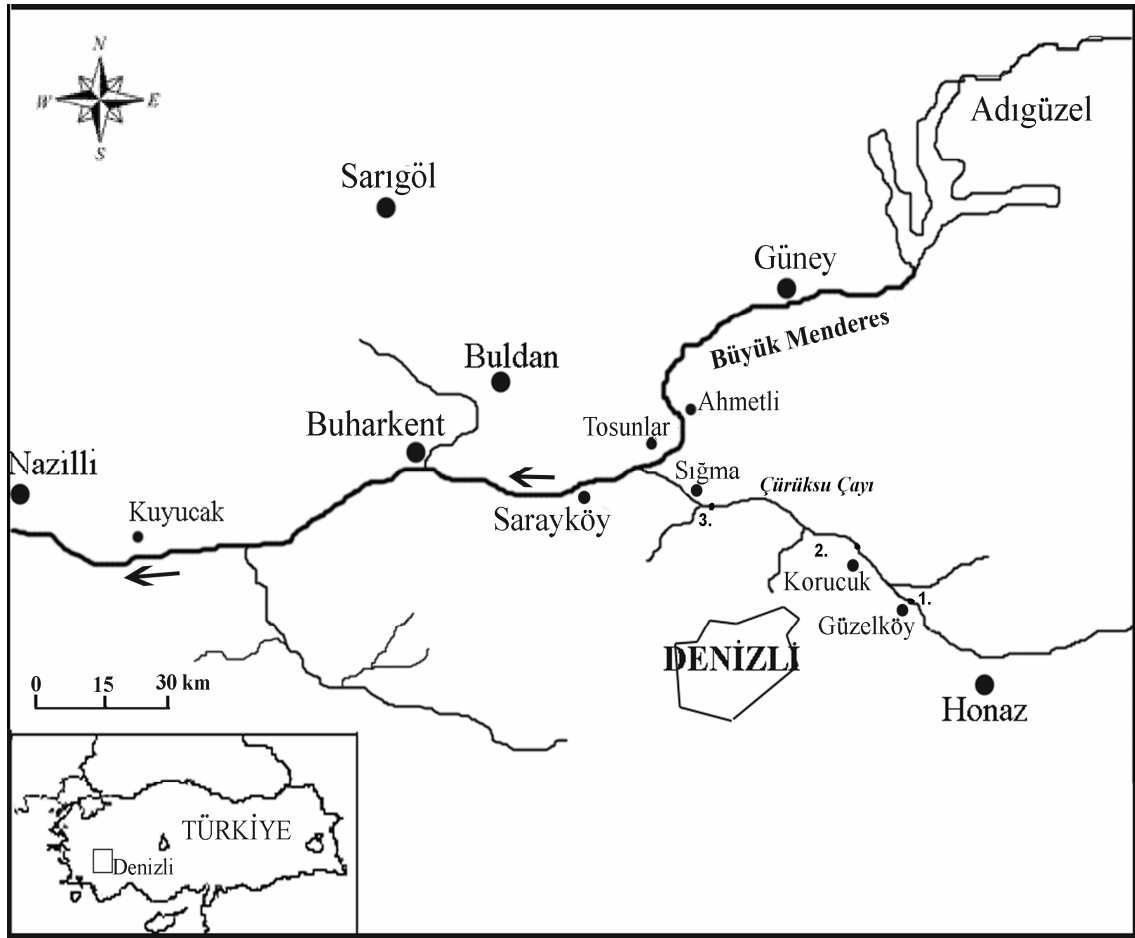
civa (II) klorür (83355), coomassie pırlanta mavisi R-250 (27816), çinko klorür (96468), N,N-dimetil formamid (40225), Absolute Etanol (32221), fosforilaz b (79700), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (49830), gliserin (15524), izobütanol (19460), izopropil alkol (24137), kadmiyum klorür monohidrat (11709), katalaz (60630), kobalt (II) klorür hegzahidrat (17739), metanol (34860), β -merkaptotanol (63690), Paraokson-metil (46192), potasyum klorür (60129), sitokrom c (30400), sodyum karbonat (31432), sodyum klorür (13423), tris (33742), yumurta albumini (05438), Fluka Chemie (GmbH Industrie Strasse 25 CH-9471 Buchs/Switzerland)'den elde edilmiştir. Dietanolamin (DEA; 8.03116), hidroklorik asit (1.00314), potasyum monohidrojen fosfat (1.05101), potasyum dihidrojen fosfat (1.04873), sodyum dodesil sülfat (SDS; 13460), Triton X-100 (11869) E. Merck (Darmstadt, Germany)'den elde edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasallar mümkün olan en yüksek düzeyde analitik saflıkta elde edilmiştir. Metil- paratiyon, metomil ve deltametrin insektisitleri kullanılmıştır.

2.2. Metotlar

2.2.1. Canlıların temini

Denizli ili sınırları içerisindeki Büyük Menderes Nehri'ne karışan Çürüksu Çayı endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucu kirletilmektedir. Özellikle, endüstriyel ve tarımsal kirleticilere maruziyet yönünden organik kirlilik derecesine göre üç farklı istasyon belirlenmiştir. Belirlenen *L. profundicola* toplama istasyonları Şekil 2.2'de verilmiştir. Belirlenen istasyonlardan 2005-2006 bahar ve yaz aylarında ayda bir olmak üzere 8 kez numune toplanmıştır.

Çalışmada kullanılan *L. profundicola* oligoketleri Çürüksu Çayı'nın Güzelköy, Korucuk ve Sığma mevkiilerinden çamurdan eleme ile canlı olarak yakalandı. Canlılar, yaşam alanları olan nehir suyu ile olabildiğince çamurdan elenerek nehir suyu içeren kaplara aktarıldı ve bu kaplar soğutucu içerisine alınarak çalışma alanından olabildiğince çabuk Denizli'deki üniversitemiz laboratuvarına getirildi. Hala yaşamakta olan canlılar nehir suyundan ve bulunabilecek partiküllerden arındırılarak 9'ar gramlık olacak şekilde tartıldı ve alüminyum folyolara sarılarak etiketlenen paketler -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Plymouth, MN 55447) derin dondurucuya kaldırıldı.



Şekil 2.2 Çürüksu Çayı üzerindeki *L. profundicola* toplama istasyonları (1. , 2. ve 3. sırası ile istasyonları göstermektedir).

2.2.2. Canlıların sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlarının hazırlanması

Laboratuarda daha önceden ağırlıkları tartılan etiketli alüminyum folyolara sarılı canlılar -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucudan çıkartılarak hemen buz üzerine alındı. Bundan sonraki bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Canlılar, daha önceden tartılarak hazırlanan şekilde toplu olarak homojenize edildi. Ağırlıkları tartılan canlı gruplarına 3 mM EDTA pH 7,8; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 mM PMSF; 0,3 mM ϵ -ACA; 0,15 mM BHT; %10 gliserol ve %0,15 Triton X-100 içeren homojenizasyon çözeltisi eklenerek buz içine oturtulmuş olan Potter-Elvehjem cam-teflon homojenizatörde homojenizasyon işlemi uygulandı. Homojenizatör tüpüne alınan canlı ağırlığının 3 katı homojenizasyon çözeltisi eklendi. Homojenizasyon işlemi teflon tokmak cam tüp içinde 5 kez aşağı-yukarı şekilde hareket ettirilerek ve dakikada 2600

dönüş yapacak şekilde çevrilerek gerçekleştirildi. Teflon çubuğun döndürülmesi işlemi matkap (Skil 6375-Konijnenberg 60-Breda-Netherlands) kullanılarak yapıldı.

Fraksiyon eldesi çalışmaları bölüm laboratuvarımızda optimize edilmiş olan Shenkman ve Cinti (1978) metodu ile yapıldı. Elde edilen homojenat, hücresel kalıntıları uzaklaştırmak üzere Hermle Z323K (220.80.V03 rotor, Hermle Labortechnik GmbH Gosheimer Str. 56 D-78564 Wehingen, Germany) soğutmalı santrifüj kullanılarak 700 xg de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant çift katlı steril sargı bezinden süzülerek peletten ayrıştırıldı ve süpernatant 12000 xg de 25 dakika tekrar santrifüj edildi. Elde edilen fraksiyonda pelet atıldı, süpernatant ise hacminin 0,5 katı soğuk 0,16 M CaCl₂ eklenmesi ile 20000 xg de 75 dakika santrifüj edildi. Sıvı sitozol kısmı eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak etiketlendi ve -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucuda saklandı. Kalan mikrozomal pelet, soğuk homojenizasyon çözeltisi ile yıkanarak 20000 xg de 75 dakika tekrar santrifüj edildi. Çıkan süpernatant dökülerek pelete başlangıç canlı ağırlığının 0,5 katı soğuk süspansiyon tamponu (2 mL 100 mM EDTA pH 7,5; 10 mL gliserin; 90 mL distile su) eklendi ve elle homojenize edilip eppendorf tüplere eşit hacimlerde konularak -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucuda saklandı.

2.2.3. Protein miktarının tayini

Sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein konsantrasyonları Folin Phenol Reagent kullanılarak Lowry vd (1951)'e göre yapıldı.

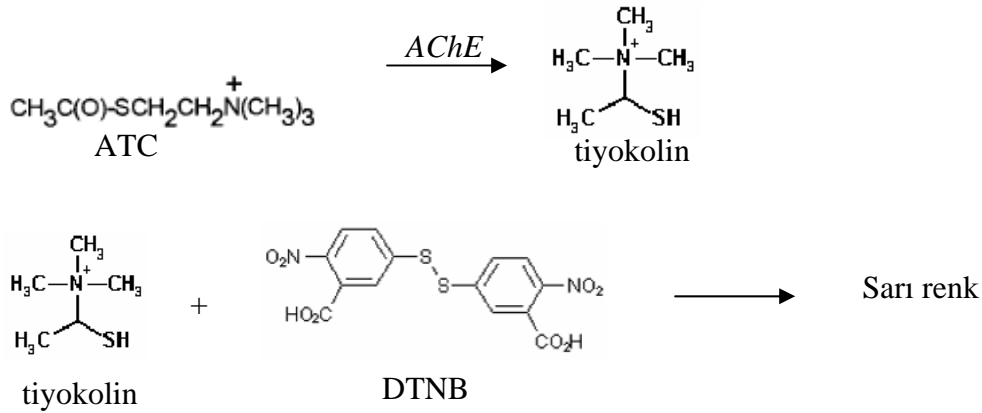
2.2.4. *L. profundicola* sitozolik kolinesteraz aktivite tayini

L. profundicola sitozolik kolinesteraz (ChE) karakterizasyonu ve aktivite tayini asetiltiyokolin (ATC), propiyoniltiyokolin (PTC) ve butiriltiyokolin (BTC) substratları kullanılarak gerçekleştirildi.

2.2.4.1. Asetiltiyokolin (ATC) aktivitesi

Hazırlanan *L. profundicola* sitozollerinde ChE aktivitesi ATC substratı kullanılarak Ellman vd (1961) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. DTNB ve ATC her çalışmada taze olarak hazırlandı. Ellman metodu, AChE tarafından oluşan

tiyokolinin DTNB ile konjugasyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoat'ın 412 nm'deki absorpsiyonuna dayanmaktadır (Bkz Şekil 2.3).



Şekil 2.3 ChE aktivitesinin DTNB ve ATC kullanılarak tayini

Tablo 2.2’de verildiği gibi tipik reaksiyon ortamı 1 ml son hacimde, belirtilen hacimlerde 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB; sitozolik protein ve 50 mM ATC kullanılarak hazırlandı. Ayrıca optimum pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu tesbitinde tipik reaksiyon ortamına 1 ml son hacimde, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB ve 50 mM ATC ilavesi ile bazal aktiviteler ölçüldü.

Tablo 2.2 Tipik AChE aktivite ölçüm karışımının içeriği

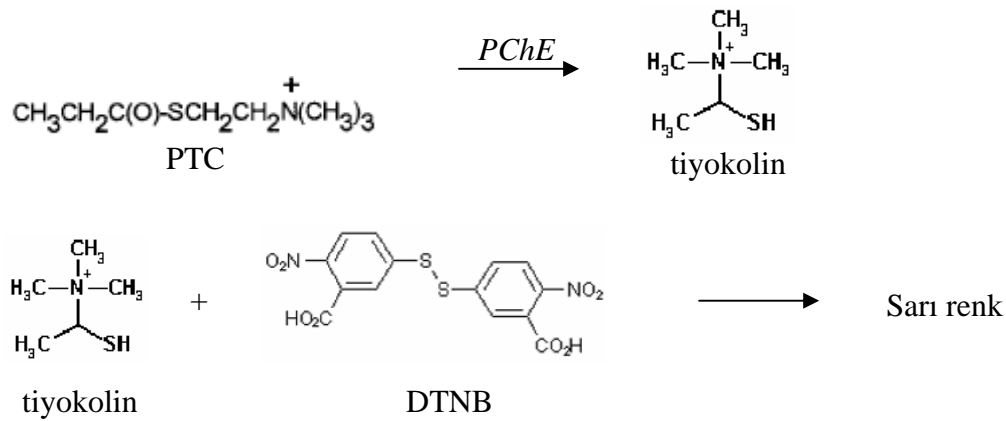
Stok çözeltiler	Eklenen hacim (ml)	Son konsantrasyon
100 mM Tris-HCl (pH 8,50)	0,770	77 mM
10 mM DTNB	0,060	0,6 mM
Sitozolik protein	0,030	50 µg
50 mM ATC	0,150	7,5 mM
Toplam	1	-

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.2’de belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son ATC substratı ilave edilerek başlatıldı ve 10 sn’lik bekleme süresinden sonra absorbans değişimi AnalytikJena Specord 200 UV-1601

(AnalytikJenaAG Kundendienst Konrad-Zuse-Str. 1 07745 Jena) Çift Işınlı Spektrofotometre’de 412 nm’de 150 sn süresince takip edildi.

2.2.4.2. Propiyoniltiyokolin (PTC) aktivitesi

Hazırlanan *L. profundicola* sitozollerinde ChE aktivitesi PTC substratı kullanılarak Ellman vd (1961) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. DTNB ve PTC her çalışmada taze olarak hazırlandı. Ellman metodu, PChE tarafından oluşan tiyokolinin DTNB ile konjugasyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoat’ın 412 nm’deki absorpsiyonuna dayanmaktadır (Bkz Şekil 2.4).



Şekil 2.4 ChE aktivitesinin DTNB ve PTC kullanılarak tayini

Tablo 2.3’te verildiği gibi tipik reaksiyon ortamı 1 ml son hacimde, belirtilen hacimlerde 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB; sitozolik protein ve 50 mM PTC kullanılarak hazırlandı. Ayrıca optimum pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu tesbitinde tipik reaksiyon ortamına 1 ml son hacimde, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB ve 50 mM PTC ilavesi ile bazal aktiviteler ölçüldü.

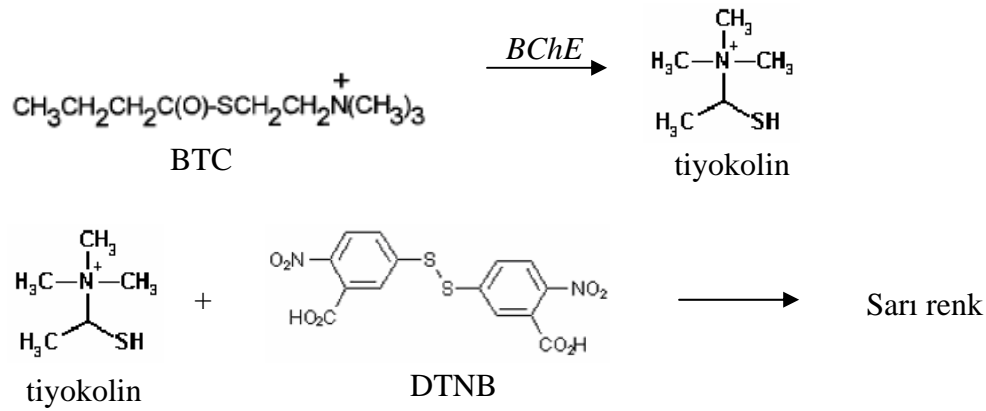
Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.3’te belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son PTC substratı ilave edilerek başlatıldı ve 10 sn’lik bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Analytik Jena Specord 200 UV-1601 (AnalytikJenaAG Kundendienst Konrad-Zuse-Str. 1 07745 Jena) Çift Işınlı Spektrofotometre’de 412 nm’de 150 sn süresince takip edildi.

Tablo 2.3 Tipik PChE aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok çözeltiler	Eklene hacim (ml)	Son konsantrasyon
100 mM Tris-HCl (pH 8,50)	0,810	81 mM
10 mM DTNB	0,060	0,6 mM
Sitozolik protein	0,030	50 µg
50 mM PTC	0,100	5 mM
Toplam	1	-

2.2.4.3. Butiriltiyokolin (BTC) aktivitesi

Hazırlanan *L. profundicola* sitozollerinde ChE aktivitesi BTC substratı kullanılarak Ellman vd (1961) tarafından önerilen spektrofotometrik metotla tayin edildi. DTNB ve BTC her çalışmada taze olarak hazırlandı. Ellman metodu, BChE tarafından oluşan tiyokolinin DTNB ile konjugasyonu sonucu oluşan sarı renkli 5-thio-2-nitrobenzoat'ın 412 nm'deki absorpsiyonuna bağlı olarak ölçüldü (Bkz Şekil 2.5).

**Şekil 2.5** ChE aktivitesinin DTNB ve BTC kullanılarak tayini

Tablo 2.4'te verildiği gibi tipik reaksiyon ortamı 1 ml son hacimde, belirtilen hacimlerde 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB; sitozolik protein ve 25 mM BTC kullanılarak hazırlandı. Ayrıca optimum pH, sıcaklık ve substrat konsantrasyonu tesbitinde tipik reaksiyon ortamına 1 ml son hacimde, 100 mM Tris-HCl tamponu (pH 8,50); 10 mM DTNB ve 50 mM PTC ilavesi ile bazal aktiviteler ölçüldü.

Tablo 2.4 Tipik BChE aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok çözeltiler	Eklene hacim (ml)	Son konsantrasyon
100 mM Tris-HCl (pH 8,50)	0,780	78 mM
10 mM DTNB	0,060	0,6 mM
Sitozolik protein	0,60	100 µg
25 mM BTC	0,100	2,5 mM
Toplam	1	-

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.4'te belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, spektrofotometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son BTC substratı ilave edilerek başlatıldı ve 10 sn'lik bekleme süresinden sonra absorbans değişimi Analytik Jena Specord 200 UV-1601 (AnalytikJenaAG Kundendienst Konrad-Zuse-Str. 1 07745 Jena) Çift Işınlı Spektrofotometre'de 412 nm'de 150 sn süresince takip edildi.

2.2.5. ChE aktivitesinin *L. profundicola* sitozollerinde karakterizasyonu

Sığma istasyonundan toplanan *L. profundicola* sitozollerinde AChE aktivitesinin protein miktarı, pH, sıcaklık, zaman ve substrat (ATC, PTC ve BTC) miktarı ile değişimi incelendi ve optimum değerler tespit edildi.

2.2.5.1. Protein miktarının ChE aktivitesi üzerine etkisi

2.2.5.1.1. AChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Tablo 2.2'de verilen reaksiyon karışımı 16; 32; 48; 64; 80; 96 ve 112 µg olacak şekilde farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve *L. profundicola* sitozollerindeki AChE aktivitesinin protein miktarı ile etkileşimi tespit edildi.

2.2.5.1.2. PChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımı 16; 32; 48; 64; 80; 96; 112; 128 ve 160 µg olacak şekilde farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve *L. profundicola* sitozollerindeki PChE aktivitesinin protein miktarı ile etkileşimi tespit edildi.

2.2.5.1.3. BChE aktivitesinin protein konsantrasyonu ile değişimi

Tablo 2.4'te verilen reaksiyon karışımı 16; 32; 48; 64; 80; 96; 112; 128; 160; 192; 240 ve 320 µg olacak şekilde farklı protein konsantrasyonlarında tekrarlandı ve *L. profundicola* sitozollerindeki BChE aktivitesinin protein miktarı ile etkileşimi tespit edildi.

2.2.5.2. ChE aktivitesi üzerine pH etkisi

Tablo 2.2, 2.3 ve 2.4'te verilen reaksiyon karışımları pH'sı 7,00; 7,50; 8,00; 8,50; 9,00; 9,50 ve 10,00 olan 100 mM Tris-HCl tamponu kullanılarak, pH'ın AChE, PChE ve BChE aktiviteri üzerine olan etkisi incelendi.

2.2.5.3. ChE aktivitesine inkübasyon sıcaklığının etkisi

Tablo 2.2, 2.3 ve 2.4'te verilen reaksiyon karışımlarından Tris-HCl tamponu pH 8,5 ve sitozolik fraksiyonlar 4 °C, 10 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C gibi onbir farklı sıcaklıkta 5 dak inkübe edilerek 412 nm'de 150 sn süresince absorbans değişimi takip edildi. Ayrıca Analytik Jena Specord 200 UV-1601 (AnalytikJenaAG Kundendienst Konrad-Zuse-Str. 1 07745 Jena) Çift Işınlı Spektrofotometre Nüve (Nüve Cooling Bath Type BS 302 (S) Esenboğa Yolu 22 km Akyurt 06287 Ankara-Türkiye) Soğutmalı Su Banyosuna bağlandı ve küvet haznesinde de su sirkülasyonu ile ölçümü yapılan her bir sıcaklık değeri sağlandı. *L. profundicola* sitozollerinde AChE, PChE ve BChE aktiviterinin sıcaklık ile etkileşimi tayin edildi.

2.2.5.4. ChE aktivitesinin zamanla değişimi

DTNB'nin tiyokolin ile konjugasyonu sonucu oluşan absorbans değişimi 0'dan başlayarak 600 sn süresince takip edilerek AChE, PChE ve BChE aktiviterinin zamana karşı değişimi ve ne kadar süre doğrusallık gösterdiği tayin edildi.

2.2.5.5. ChE aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisi

2.2.5.5.1. ATC konsantrasyonunun etkisi

Reaksiyon karışımı 0,25 ile 10 mM arasında değişen ATC konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve AChE aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile doğrusallığı ve saturasyon kinetiği çalışıldı.

2.2.5.5.2. PTC konsantrasyonunun etkisi

Reaksiyon karışımı 0,125 ile 6,25 mM arasında değişen PTC konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve PChE aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile doğrusallığı ve saturasyon kinetiği çalışıldı.

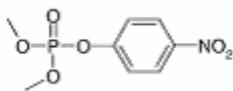
2.2.5.5.3. BTC konsantrasyonunun etkisi

Reaksiyon karışımı 0,125 ile 3,75 mM arasında değişen BTC konsantrasyonları kullanılarak inkübe edildi ve BChE aktivitesinin substrat konsantrasyonu ile doğrusallığı ve saturasyon kinetiği çalışıldı.

2.2.5.6. *L. profundicola* sitozolik kolinesteraz aktivitesi üzerine *in vitro* paraokson-metil inhibisyonu

ChE aktivitesi üzerine inhibitör etkisi, organofosfatlı insektisit metil-paratyon'un okson metaboliti olan paraokson-metil kullanılarak çalışıldı. Paraokson-metil'in moleküler yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir.

20 mM'lık stok çözelti için hesaplanan hacimde Paraokson-metil 0,50 ml etanolde çözülerek Tris-HCl pH 8,50 ile belirlenen hacime tamamlandı ve 20 mM'lık stok çözelti üzerinden seri dilüsyonları elde edildi. Her çalışmada taze olarak hazırlanan dilüsyonlar son konsantrasyonları 0,005µM; 0,01 µM; 0,025 µM; 0,05 µM ve 0,1 µM olacak şekilde reaksiyon ortamına eklendi ve 5 dak'lık inkübasyon sonrasında substratın ilavesi ile başlayan reaksiyon 412 nm'de 150 sn süresince takip edildi. Tespit edilen paraokson-metil konsantrasyonlarının ATC, PTC ve BTC substratları için belirlenen 4 farklı substrat konsantrasyonunda enzim aktivitesi üzerine etkisi ve inhibisyon kinetikleri çalışıldı.

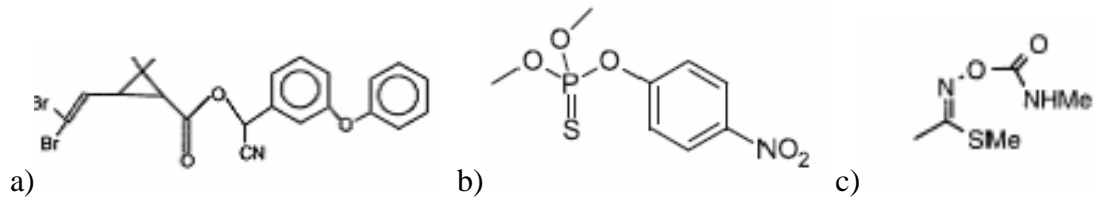


Şekil 2.6 Paraokson-metil'in moleküler yapısı

2.2.6. *L. profundicola* sitozolik kolinesteraz aktivitesi üzerine *in vivo* insektisit ve petrokimyasal atık etkisi

Çürüksu Çayı üzerinde belirlenen Korucuk mevkiinden toplanan *L. profundicola*'lar doğal ortamlarından alınan sediment ve nehir suyu ile birlikte üniversitemiz laboratuvarına getirildi.

Eşit miktarlarda sediment içeren kaplara eşit miktarlarda canlılardan aktarıldı ve her bir kaba 1 lt doğal ortam sularından eklendi. Kaplara hava pompası bağlanarak, insektisitler üzerinde belirtilen LD₅₀ değerleri üzerinden 1/5 oranında azaltılarak deltametrin (200 µl/lt), metil-paratiyon (100µl/lt), metomil (0,1gr/lt) insektisitleri ve 1:1 oranında doğal ortam suyu ile karıştırmak suretiyle petrol rafinerisinden temin edilen atık çamur ve atık su eklendi ve kontrol grubu ile birlikte canlıların 4 günlük maruziyeti izlendi. Deltametrin, metil-paratiyon ve metomil'in moleküler yapıları Şekil 2.7'de verilmiştir. Canlılar uygulamanın 1. ve 3. günü olmak üzere 48 sa'lik periyotlarla Tetramin fish food ile beslendi. Maruziyetin 1., 2., 3. ve 4. günlerinde 24 sa'lik periyotlarla kaplardan 9'ar gram canlı alınarak buz üzerinde alüminyum folyolara sarıldı ve etiketlenerek -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucuya kaldırıldı. Canlılar en fazla 3 gün içersinde materyal ve metotta belirtilen şekilde homojenize edildi. Elde edilen sitozolik ve mikrozomal fraksiyonlar eppendorflara aktarılarak etiketlendi ve ChE ve EROD aktivite ölçümleri için -80 °C Nuãire (Nuãire Ultralow Freezer NU-6382E 2100 Fernbrook lane Ploymouth, MN 55447) derin dondurucuya kaldırıldı.



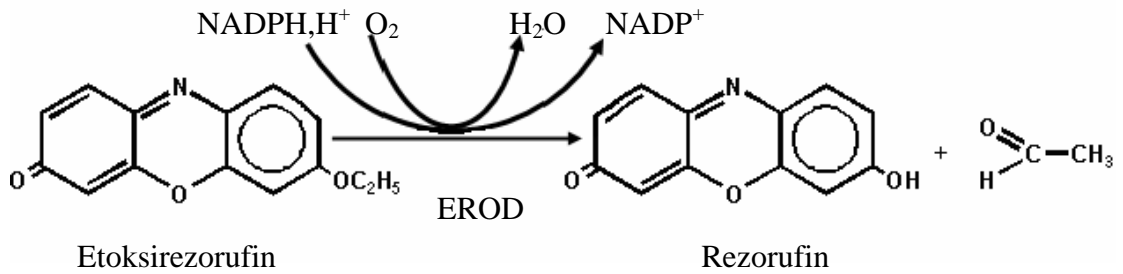
Şekil 2.7 Deltametrin (a), Metil-paratiyon (b) ve Metomil (c)'in moleküler yapıları

2.2.7. *L. profundicola* etoksirezorufin-O-deetilaz (EROD) aktivite tayini

Hazırlanan *L. profundicola* mikrozomlarında EROD aktivitesi 7-etoksirezorufin substratı kullanılarak Burke ve Mayer (1974) tarafından önerilen florometrik metoda dayanarak optimize edilen Arınç ve Şen (1994)'e göre tayin edildi. Bu metod, 7-etoksirezorufin'in CYP1A1 tarafından NADPH varlığında rezorufin'e

yükseltgenmesinin 535 nm eksitasyon ve 585 nm emisyon dalga boylarında florometrik olarak takibine dayanmaktadır (Bkz Şekil 2.8).

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.5'te belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dak boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak rezorufin'in bilinen miktarı eklendi ve floresanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.



Şekil 2.8 Etoksirezorufin-*O*-deetilaz reaksiyonu

Tablo 2.5 EROD aktivite ölçüm karışımının içeriği

Stok çözeltiler	Eklene hacim (ml)	Son konsantrasyon
400 mM KPi tamponu (pH 7,80)	0,250	100 mM
1 M NaCl	0,100	100 mM
12 mg/ml BSA	0,100	1,2 mg
Mikrozomal protein (2 mg/ml)	0,100	200 µg
10 mM NADPH	0,010	0,1 mM
10 µM Etoksirezorufin	0,150	1,5 µM
Distile su	0,290	-
Toplam	1	-

Reaksiyon çözeltisinin hazırlanmasında Tablo 2.5'te belirtilen hacimlerde stok çözeltilerden alınarak, florometre küvetinde 1 ml reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon en son substrat ilave edilerek başlatıldı ve reaksiyon Cary Eclipse (Varian Ltd., 28 Manor Road, Walton-on-Thames, Surrey KT12 2Qf, England) Florometre'de 2 dak boyunca takip edildi. Son olarak, reaksiyon karışımına iç standart olarak

rezorufin'in bilinen miktarı eklendi ve floresanstaki artış kaydedildi. Enzim aktiviteleri, rezorufin eklenmesinin neden olduğu floresans artış kullanılarak hesaplandı.

2.2.8. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) iyonik deterjan sodyum dodesil sülfat (SDS), varlığında Laemmli (1970) tarafından tanımlanmış olan kesintili bir tampon sisteminde %8,5 ayırma ve %4 sıkıştırma jellerinde yapılmıştır. sitokrom c (M_r 11700), gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (M_r 36000), yumurta albumini (M_r 45000), katalaz (M_r 60000), BSA (M_r 66000), moleküler ağırlık standartları olarak kullanılmıştır. SDS-PAGE'in detayları aşağıda verilmiştir.

2.2.8.1. Stok çözeltiler

2.2.8.1.1. 10X elektrot tamponu (25 mM Tris, 192 mM Glisin, pH 8,30)

30 g Tris ve 144 g glisin distile suda çözüldü ve son hacim 1 lt'ye tamamlandı. Tamponun pH'sı asit veya bazla ayarlanmadı. Tampon kullanımdan önce 1 lt tampona 1 g SDS eklenerek 10 kez sulandırılarak kullanıldı.

2.2.8.1.2. Stok ayırma jel tamponu (1,5 M Tris-HCl, pH 8,80)

18,15 g Tris yaklaşık 60 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 8,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.8.1.3. Stok sıkıştırma jel tamponu (1 M Tris-HCl, pH 6,80)

6 g Tris yaklaşık 40 ml distile suda çözüldü, pH'sı 10 M HCl ile 6,8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.8.1.4. Stok jel çözeltisi (Akrilamid-BIS, %30 T, %2,67 C)

29,2 g akrilamid bir miktar distile suda çözüldü; 0,8 g BIS (Bis-akrilamid) eklendi ve çözelti distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra çözelti kaba filtre kağıdından süzüldü. %T toplam akrilamid monomer konsantrasyonunun yüzdesini gösterir ve %C aşağıda gösterildiği gibi çapraz bağlanan monomer konsantrasyonunu tanımlar.

$$\%T = (g \text{ Akrilamid} + g \text{ BIS} / \text{toplam hacim}) \times 100$$

$$\%C = (\text{g BIS/g Akrlamid} + \text{g BIS}) \times 100$$

2.2.8.1.5. %10 SDS

10 g SDS ısıtılarak distile suda çözüldü ve son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

2.2.8.1.6. %10 Amonyum persülfat (APS)

0,1 g amonyum persülfat 1 ml distile suda çözüldü. Her seferinde taze olarak hazırlandı.

2.2.8.1.7. 4X Numune seyreltme tamponu

%8 SDS, %40 gliserin, %20 β -merkaptolan ve %0,01 bromfenol mavisi içeren 0,25 M Tris-HCl (pH 6,80) Tablo 2.6'da verilen çözeltilerin belirtilen hacimlerde karıştırılması ile hazırlandı. Tamponun pH'sı son hacme tamamlanmadan önce 1 M HCl ile 6,80'e titre edildi.

Tablo 2.6 4X numune sulandırma tamponunun içeriği

Stok çözeltiler	Eklenen Hacim (ml)
1 M Tris-HCl (pH 6,80)	2,5
Gliserin	4,0
B-merkaptolan	2,0
SDS	0,8 g
Bromfenol mavisi	1,0 mg
Toplam Hacim	10

2.2.8.1.8. Stok moleküler ağırlık standart çözeltileri

Moleküler ağırlık standart proteinleri, sitokrom c, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, yumurta albumini, katalaz ve BSA 1 ml'lik volumetrik şişe içinde 1 mg çözülerek 2 mg/ml stok çözeltisi şeklinde hazırlandı. Stok standartlar derin dondurucuda saklandı.

2.2.8.1.9. Jel polimerizasyon çözeltilerinin hazırlanması

Ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jel solüsyonları Tablo 2.7'de belirtildiği gibi verilen miktarların karıştırılması ile verilen sırayla kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Tablo 2.7 SDS-PAGE ayrıştırıcı ve sıkıştırıcı jellerin formülasyonları

İçerik	Ayrıştırıcı Jel (%8,5) (0,375 M Tris, pH 8,80)	Sıkıştırıcı Jel (%4) (0,125 M Tris, pH 6,80)
Jel Çözeltisi(ml)	8,5	1,5
Distile Su (ml)	13,55	5,88
Ayrıştırıcı Jel Tamponu (ml)	7,5	-
Sıkıştırıcı Jel Tamponu (ml)	-	2,5
%10 SDS (ml)	0,4	0,16
%10 APS (ml)	0,15	0,065
TEMED (ml)	0,015	0,012
Toplam Hacim	30	10

2.2.8.2. Prosedür

2.2.8.2.1. Jelin hazırlanması

Poliakrilamid slab jelleri, jel sandviçinin hazırlanması ile The Emperor Penquin Water Cooled Dual Gel Electrophoresis System Model P9DS (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, NH USA) elektroforez sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk önce jel sandviçi temiz ve düz bir zemin üzerinde önce uzun camın (14 x 16 cm), bunun üzerine 0,8 mm'lik teflon ayırıcılar ile sabitleyici plastik levhanın ve son olarak kısa camın (12,5 x 16 cm) üst üste yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Bunu, sandviçin sisteme oturtularak vidalarla sıkıştırılması ve sandviçin oturtulduğu tabandaki kuyucuğa %2'lik agaroz dökülerek sisteme sabitlenmesi izledi. Daha sonra ayrıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu Tablo 2.7' de belirtilen oranlarda hazırlanarak sandviç içindeki çözeltinin istenilen yüksekliğe (8-9 cm) ulaşmaya kadar 10 ml'lik bir pipet yardımı ile teflon ayırıcıların bir köşesinden jel sandviçin içine doğru transfer edildi. Ucu bükülmüş iğneli bir şırınga kullanılarak, düz bir jel yüzey oluşumunu sağlamak için nazikçe boşlukların bir köşesinden fışkırtılmak suretiyle jel polimerizasyon solüsyonunun yüzeyi yaklaşık 0,1 cm kalınlığında bir izopropil alkol tabakasıyla kaplandı. Jel sonradan oda sıcaklığında 15-20 dak süreyle polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyondan sonra alkol tabakası tamamen boşaltıldı ve hazırlanan sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu 5 ml'lik pipet kullanılarak sandviç tamamen dolana kadar bir teflon ayırıcının köşesinden jel sandviçinin içine döküldü. Sıkıştırıcı jel eklendikten

sonra 15 tane diş içeren 0,8 mm'lik teflon tarak, tarağın dişi içinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde sıkıştırıcı jel polimerizasyon solüsyonu katmanına yerleştirildi. Polimerizasyon oda sıcaklığında yaklaşık 30 dak'da tamamlandı.

2.2.8.2.2. Örneğin ve moleküler ağırlık standartlarının hazırlanması

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi için kontrol ve metil kolantren (MC)'e maruz bırakılmış rat ile kontrol, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılmış *L. profundicola* mikrozoamları kullanıldı. Analiz edilecek proteinlerden alınan bir örnek 4X numune seyreltme tamponu ile 3:1 oranında (3 kısım örnek ve 1 kısım tampon) seyreltildi ve sıcak su banyosunda 2 dakika süre ile kaynar suda kaynatıldı.

Moleküler ağırlık standartları da şu şekilde hazırlandı: 16 µl sitokrom c, 14 µl gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz, 16 µl yumurta albumini, 12 µl katalaz, 12 µl BSA, 20 µl distile su ve 30 µl 4X numune seyreltme tamponu (standartların miktarı çok sayıda denemenin sonucunda tespit edilmiştir). Seyreltilmiş karışım daha sonra 2 dak süreyle sıcak su banyosunda kaynatıldı.

2.2.8.2.3. Örneklerin yüklenmesi

Teflon tarak dişleri yırtmadan dikkatlice sıkıştırıcı jelden çıkarıldı. Kuyucuklar eğer varsa herhangi bir hava kabarcığını uzaklaştırmak için ince iğneye sahip bir şırınga kullanılarak elektrot tamponu ile dolduruldu. Daha sonra blok alt ve üst rezervuarları elektrot tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi.

Uygun iğneli bir Hamilton şırıngası kullanılarak 30 µl (125 µg 3-MC rat ve kontrol rat ile 150 µg kontrol, deltametrin, metoil, meil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılmış *L. profundicola* mikrozoamlarından) protein örneklerinden ve 10 µl moleküler ağırlık standartlarından kuyucukların tabanında ince bir katman olacak şekilde kuyucuklara yüklendi.

2.2.8.2.4. Elektroforetik ayırıştırma

Sistem Thermo EC 1000-90 (100 Colin Drive Holbrook, NY 11741-4306, USA) güç kaynağına bağlandı. Sisteme aynı anda iki jel sandviçi hazırlanarak aynı anda iki elektroforetik ayırıştırma yapıldı. Elektroforetik ayırıştırmanın yapılacağı iki jel için sıkıştırıcı jel üzerinde 20 mA'lık sabit akım yürütme işlemi yapıldı. Yol gösterici boya

ayırıştırıcı jele ulaştığında akım 30 mA'e sıkıştırıcı jelden çıktığında ise 40 mA'e çıkarıldı (Eğer tek jel kullanılarak elektroforetik ayırıştırma yapılacaksa mA değerleri yarılandı). Elektroforetik ayırıştırma süresince ısınmayı engellemek için sisteme 5°C'ye ayarlanmış Nüve (Nüve Cooling Bath Type BS 302 (S) Esenboğa Yolu 22 km Akyurt 06287 Ankara-Türkiye) Soğutmalı Su Banyosu bağlandı. Yol gösterici boya tabana ulaşacağı zaman (ayırıştırıcı jelin başlangıcından yaklaşık 6-7 cm) güç kaynağı kapatıldı. İyi bir ayırıştırma sağlamak için toplam 5-5,5 saat yürütme yapıldı.

2.2.8.2.5. Jelin boyanması ve bağlanmayan boyanın uzaklaştırılması

Elektroforez tamamlandıktan sonra, jel bloğu aparattan alındı ve iliştirilmiş jel sandviç çıkarılarak kısa cam tabaka dikkatlice açıldı. Jel yol gösterici boyanın olduğu yerden, kenarlardan, sıkıştırıcı jel bitiminden kesildi ve üstten sol köşesi (1 numaralı kuyucuk) kuyucukların sıralarını belirlemek için işaretlendi. Jel uzun cam tabakadan dikkatlice alındı ve oda sıcaklığında 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Pırlanta Mavis R 250, %50 metanol ve %12 glasial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak hem boyandı hem de sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözülmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jellerden bazıları fotoğraflandı ve boyası çıkarılmış jeller %7'lik asetik asit çözeltisi içinde saklandı.

2.2.8.3. Western blot analizleri

Western blot prosedürü Khyse-Anderson (1984) ile Tovey ve Baldo (1987) tarafından tanımlandığı gibi uygulanmıştır. Ancak bizim laboratuvar koşullarımıza göre optimize edilmiştir.

2.2.8.3.1. Proteinlerin elektroforezi

Seçilen mikrozomlar (rat ve *L. profundicola*) yukarıdaki bölümlerde tanımlandığı gibi denatüre koşullar altında %4'lük sıkıştırıcı ve %8,5'lük ayırıştırıcı jeller içinde elektroforez edildi. Elektroforezi takiben, jeller transfer tamponu (25 mM Tris, 192 mM glisin ve %10 metanol) içersinde 10 dakika süreyle sabit hızlı bir çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Jelin ön dengelenmesi SDS ve elektroforez tampon tuzlarının uzaklaştırılmasını kolaylaştırır ve elektroforetik transferlerden önceki jelin son şeklinin

ayarlanmasına yardımcı olur. Aksi takdirde transfer süresince jeller metanol içerisinde ebat değişikliğine uğrayabilir.

2.2.8.3.2. Transfer sandviçinin hazırlanması

Nitroselüloz membran jel boyutlarından 0,2 mm daha geniş olmak üzere kesildi ve 5 dak süreyle transfer tamponu ile inkübe edilerek ıslatıldı. Membranın bütün yüzeyinin ıslatılması proteinlerin membrana bağlanması için son derece önemlidir. Eğer membran 5 dak içinde ıslanmazsa, bu membran proteinlerin transferi için kullanılamaz, çünkü bu durum depolama sırasında membranın dehidrasyona uğradığını ve proteinleri bağlama yeteneğini kaybettiğini gösterir. Bu işlem sırasında membranların taşınması, tutulması için yumuşak uçlu forsep kullanıldı ve kontaminasyonlardan kaçınmak için eldiven giyildi. Daha sonra dört adet Whatman #1 jel boyutlarından 0,1 mm daha büyük ölçülerde kesildi ve transfer tamponu ile ıslatıldı, ancak içlerinde saklı kalan hava kabarcıklarının tamamen ayrılmasını sağlamak için ilk olarak saf suyla ve daha sonra transfer tamponu ile ıslatıldı.

Elektroforetik transfer The Panther Semidry Electrobloetter Model HEP-3 221663 (55 Heritage Avenue Portsmouth, NH 03801 USA) kullanılarak Yarı-kuru Western blot yöntemi uygulanarak yapıldı. The Panther Semidry Electrobloetter Model HEP-3 221663 (55 Heritage Avenue Portsmouth, NH 03801 USA)'in platinyum tabanına önceden nemlendirilmiş Whatman # 1 yerleştirildi ve olası kalabilecek hava kabarcıklarını gidermek amacıyla bir deney tüpü üzerinde yuvarlandı. Whatman # 1 üzerine 1 nolu kuyucuğu gösteren çentik sağda kalacak şekilde dikkatlice yerleştirilen jelin üzerine membran da dikkatlice yerleştirildi. Proteinlerin transferini bloke edecek olan jel ile membran arasında hava kabarcıkları kalmasının engellenmesi bakımından bu kritik basamaklardan biridir. Bu nedenle membran birbirine zıt uçlardan tutularak öncelikle jelin ortasına degecek şekilde iki tarafa doğru yayarak yerleştirildi. Daha sonra membran üzerine önceden ıslatılmış başka bir Whatman # 1 konarak sandviç tamamlandı. Hava kabarcıklarının tamamen uzaklaştırılmasını sağlamak için membranı kendi pozisyonunda sabit tutarken bir deney tüpü nazikçe üzerinde yuvarlandı ve sandviç etrafına taşan fazla transfer tamponları temizlenerek alan kurulandı. Sandviç hazırlandıktan sonra üst aparat dikkatlice yerleştirildi ve sistemin vidaları sıkıldı.

2.2.8.3.3. Elektroforetik transfer

Sistem Thermo EC 1000-90 model güç kaynağına bağlandı. Voltaj ve maksimum akım limiti 10 V ve 400 mA'e ayarlandı ve 1 sa süresince proteinler elektroforetik olarak transfer edildi. Süre sonunda güç kaynağı kapatıldı, hücrenin bağlantısı kesildi ve sistemin vidaları açıldı. Sonuç olarak üzerinde transfer edilmiş proteinleri barındıran membran, 'Blot', elde edildi.

2.2.8.3.4. Proteinlerin immünokimyasal tespiti

Transfer tamamlandıktan sonra transferin ne derecede gerçekleştiğini tespit etmek için jel 45 dak süreyle %0,2 Coomassie Brilliant Blue R 250, %50 metanol ve %12 glacial asetik asit içeren boya çözeltisiyle bir karıştırıcı kullanarak boyandı ve sabitlendi. Uygun bir süre (en azından 24 saat) bağlanmayan çözünmüş boyanın uzaklaştırılması için %7'lik asetik asit içeren %30'luk metanol çözeltisi ile inkübe edildi (bu süre zarfında solüsyon birkaç kez değiştirildi). Sonuç olarak, jelden membrana transfer olamayan protein miktarı tespit edilmeye çalışıldı.

Aynı zamanda membran, protein içeren yüzeyi üste gelecek şekilde küçük plastik bir tepsinin içine yerleştirildi ve membran 1 sa süreyle bloke çözeltisi (TBST içinde yağsız %5'lik süt tozu) ile çalkalayıcı da inkübe edildi.

Süre sonunda 40 ml bloke çözeltisi içinde 100 µl çözülerek hazırlanan primer antikorlar (anti-Rat CYP1A1-IgG ve anti-Rat CYP4A-IgG), membranın üzerine boşaltıldı ve 2 sa inkübe edildi. Daha sonra membran TBST solüsyonunda her biri 5 dak olmak üzere 3 defa yıkandı. Yıkama çözeltisi, membranın tamamen temizlenmesini sağlamak için yapılan her yıkama basamağı arasında plastik tepside tamamen uzaklaştırıldı. Membran daha sonra 1 saat süreyle işaretleyici enzim-alkali fosfataz (anti-rabbit IgG-ALP konjugatı) ile bağı olan ikinci antikorlarla inkübe edildi. Membran önceden tarif edildiği gibi yıkandı. Sonuç olarak membran, antikor bağlanan proteinlerin tespiti için Ey ve Ashman (1986) tarafından Tablo 2.8'de verilen substrat çözeltisi ile inkübe edildi. Görüntü elde edildikten sonra membran havada kurutuldu, strech film ile kaplandı ve karanlıkta saklandı. Substrat çözeltisi her seferinde taze olarak hazırlandı ve kullanımdan sonra atıldı.

Tablo 2.8 Nitroselüloz membran üzerinde transfer edilen proteinlerin immünolojik tayini için substrat çözeltisi hazırlama

<p>Çözelti A: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,80 2,97 ml 1 M NaCl 4,0 ml 100 mM MgCl₂ 0,82 ml 100 mM ZnCl₂ 0,04 ml DEA 0,096 ml NBT 12,2 mg Son hacim 40 ml</p>
<p>Çözelti B: Distile suda 2 mg/ml fenazın metasülfat</p>
<p>Çözelti C: 5,44 mg BCIP/0,136 ml N, N-dimetil formamid</p>
<p>Sonuç olarak, NBT/BCIP substrat çözeltisi A çözeltisi ile C çözeltisi ve 0,268 ml B çözeltisinin karışımından hazırlandı.</p>

* A çözeltisinin pH'sı, son hacmine tamamlanmadan önce satüre Tris ile 9,55'e ayarlandı.

2.2.9. İstatistiksel analizler

Elde edilen sonuçlar her bir veri noktası için Ortalama \pm Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında kayda değer bir fark olup olmadığını analiz etmek için One Way Anova ve Two Sample-T testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. *L. profundicola* Sitozolik ve Mikrozomal Fraksiyonlarda Protein Tayini

Elde edilen sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarları Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi Lowry vd (1951)'e göre yapıldı. Sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 0,2 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı.

3.2. *L. profundicola* Sitozolik ChE Aktivitesinin Tayini

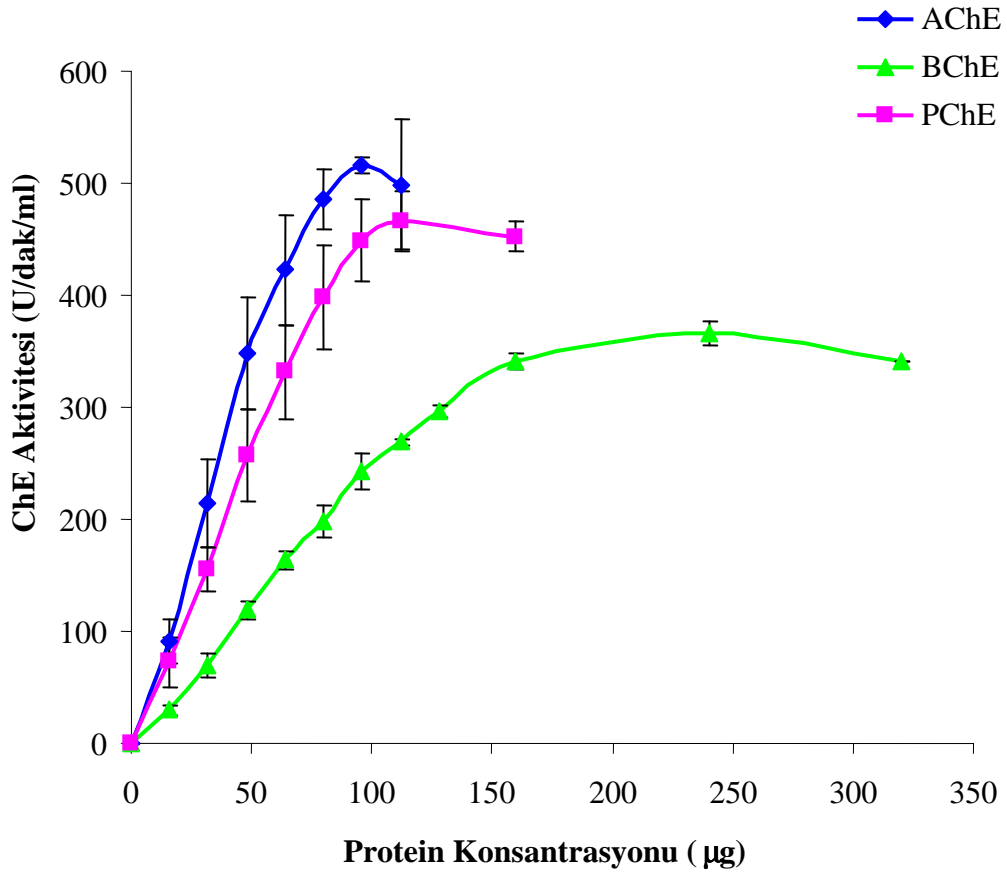
Kolinesteraz'lar *L. profundicola* sitozollerinde asetiltiyokolin (ATC) propiyoniltiyokolin (PTC) ve butiriltiyokolin (BTC) substratları kullanılarak çalışıldı. Maksimum enzim aktivitesi için optimum şartlar tespit edildi. ChE aktivitesi spektrofotometrik olarak 412 nm'de Ellman vd (1961) tarafından önerilen metoda göre ATC, PTC ve BTC test substratları kullanılarak tayin edildi.

3.3. ChE Aktivitesinin *L. profundicola* Sitozollerinde Karakterizasyonu

3.3.1. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi farklı sitozolik protein konsantrasyonlarında ChE aktivitesinin değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak incelendi. Aktivite, AChE ve PChE için 50 µg, BChE için 100 µg protein miktarına kadar lineer artma gösterdi. Bundan sonra da kısmi lineerlik AChE için 112 µg, PChE için 128 µg ve BChE için ise 240 µg'a kadar devam etti. Enzim aktivitesinin protein konsantrasyonuna göre değişimi Şekil 3.1'de verilmiştir.

Materyal ve Metotta tanımlanan farklı protein konsantrasyonlarında AChE, PChE ve BChE aktiviteleri tespit edildi. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

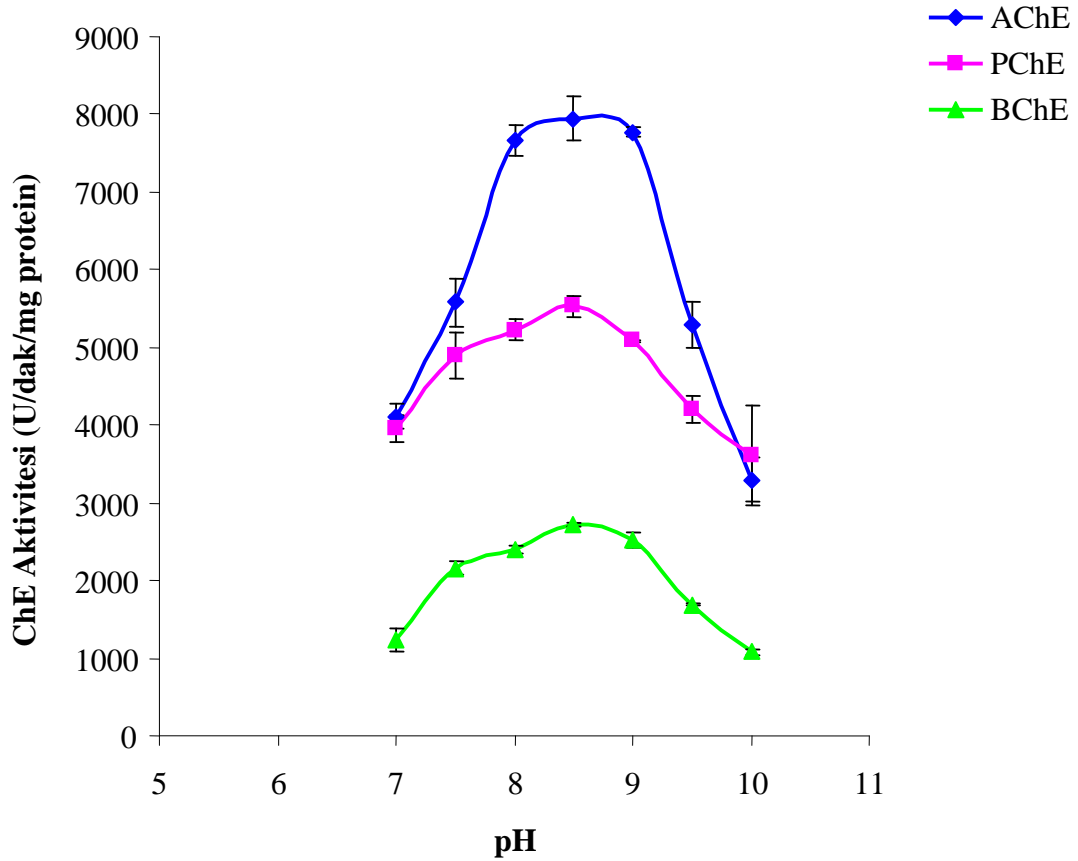


Şekil 3.1 Protein konsantrasyonunun *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi

3.3.2. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine pH etkisinin tayini

Materyal ve Metotta tanımlanan tampon sistemleri kullanılarak (pH 7,00-10,00 aralığında Tris-HCl) elde edilen pH'ın ChE aktivitesi üzerine olan etkisi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak incelendi. Ayrıca, her bir pH değeri için protein içermeyen reaksiyon ortamı hazırlandı ve 150 sn'lik bekleme süresi sonunda bazal aktivitelerinde elde edilmesi ile net aktiviteler hesaplandı. Maksimum aktivite pH 8,50'de tespit edildi. ChE aktivitesi üzerine pH etkisi Şekil 3.2'de verilmiştir.

Materyal ve Metotta tanımlanan tampon sistemi kullanılarak AChE, PChE ve BChE aktivitelerinin pH ile değişimi gösterilmiştir. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

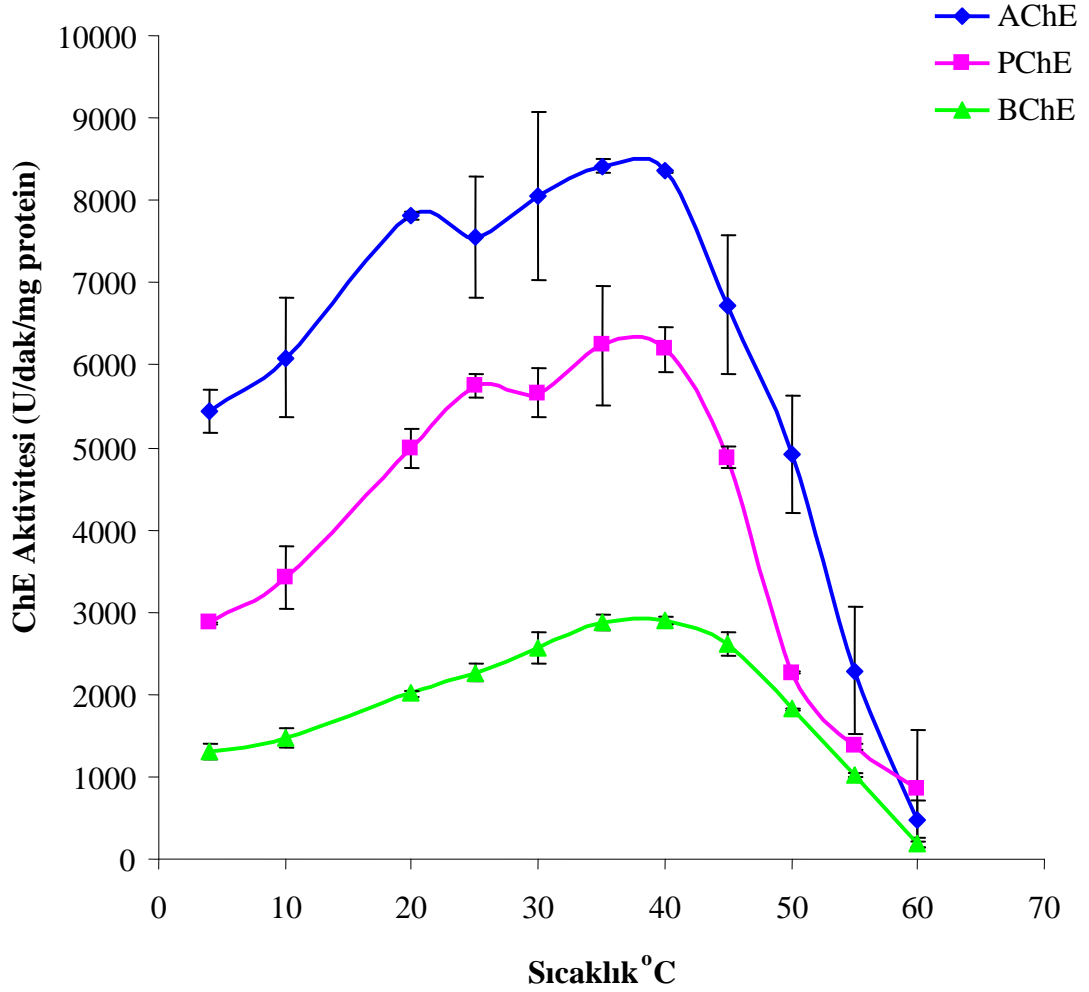


Şekil 3.2 pH'ın *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi

3.3.3. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine sıcaklık etkisi tayini

L. profundicola sitozolik AChE, PChE ve BChE aktivite değişimleri Materyal ve Metotta tanımlanan dokuz farklı reaksiyon sıcaklığında aktivitelerin ve bazal aktivitelerin hesaplanması ile (4 °C, 10 °C 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C ve 60 °C) tayin edildi. ATC, BTC ve PTC substratları için optimum sıcaklık 35 °C olarak tespit edildi. Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3.3'te verilmiştir.

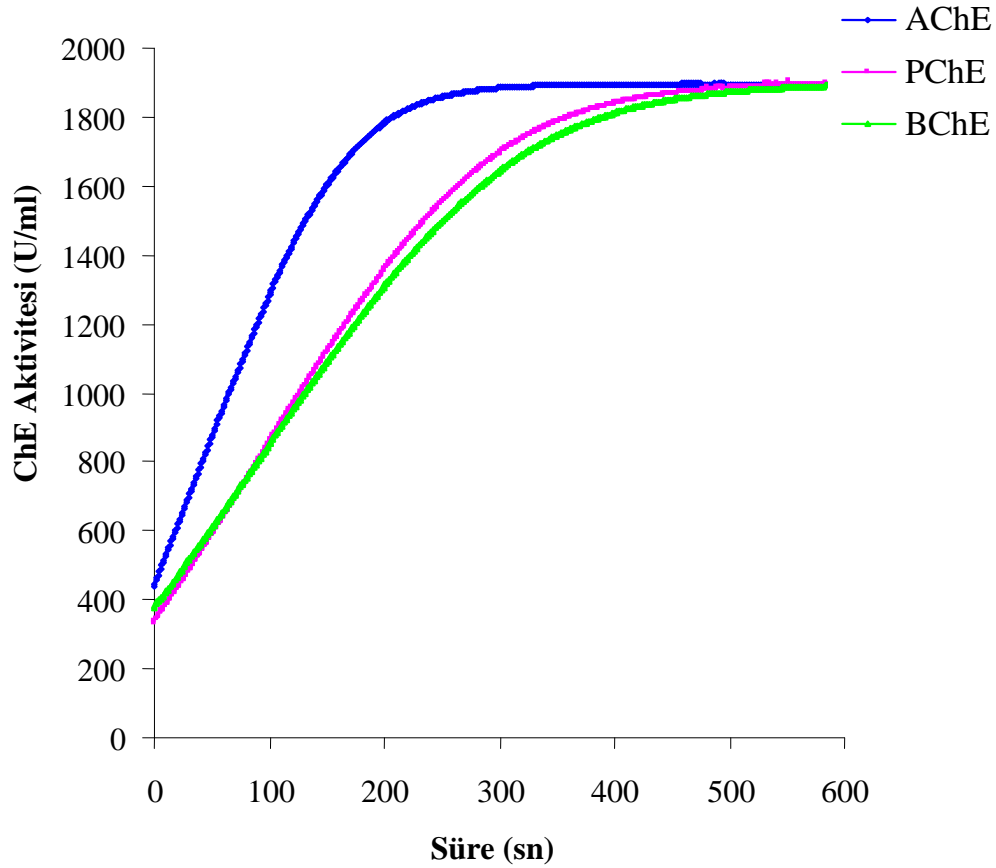
Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi AChE, PChE ve BChE aktivitelerinin sıcaklık ile değişimi gösterilmiştir. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.



Şekil 3.3 Sıcaklığının *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine etkisi

3.3.4. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesinin zamana karşı değişimi

Enzim aktivitesi 150 sn süresince lineer artış gösterdi. Bundan sonra da kısmi lineerlik AChE için 250 sn , PChE için 350 sn ve BChE için 400 sn kadar devam etti. Enzim aktivitesinin zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 3.4'te verilmiştir.



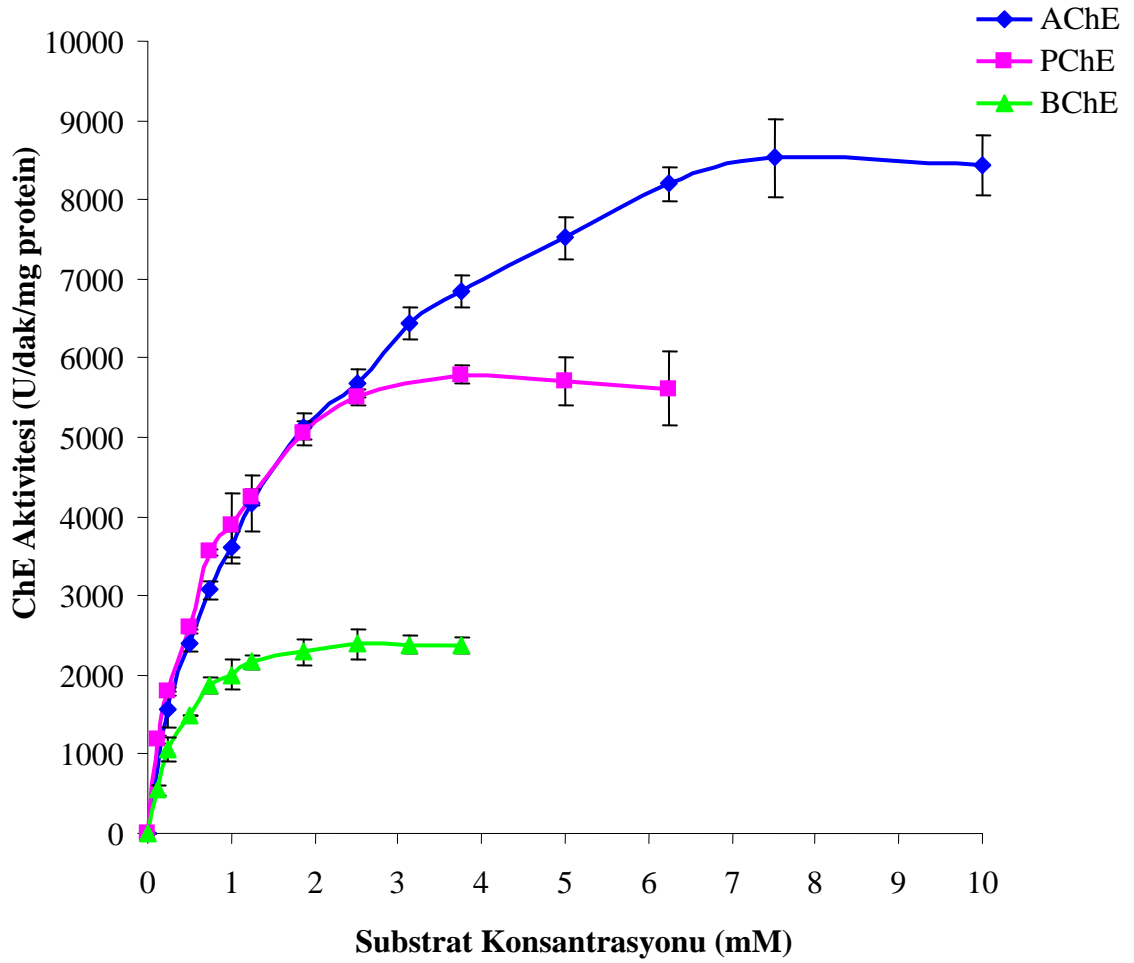
Şekil 3.4 *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesinin zamanla değişimi

3.3.5. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi üzerine substrat konsantrasyonunun etkisinin tayini

3.3.5.1. ATC konsantrasyonunun etkisinin tayini

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,25 mM ile 10 mM arasında değişen ATC konsantrasyonlarında ChE aktivitesi tespit edildi. 7,5 mM substrat konsantrasyonuna kadar aktivitenin artma gösterdiği belirlendi. *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesine ATC konsantrasyonunun etkisi ve Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. K_m değeri 1,202 mM; V_{max} değeri 8636 U/dak/mg protein olarak bulundu. V_{max} ve K_m değerleri Excel programı kullanılarak hesaplandı.

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,25 mM ile 10 mM arasında değişen ATC konsantrasyonları ile inhibisyon gerçekleştirildi. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

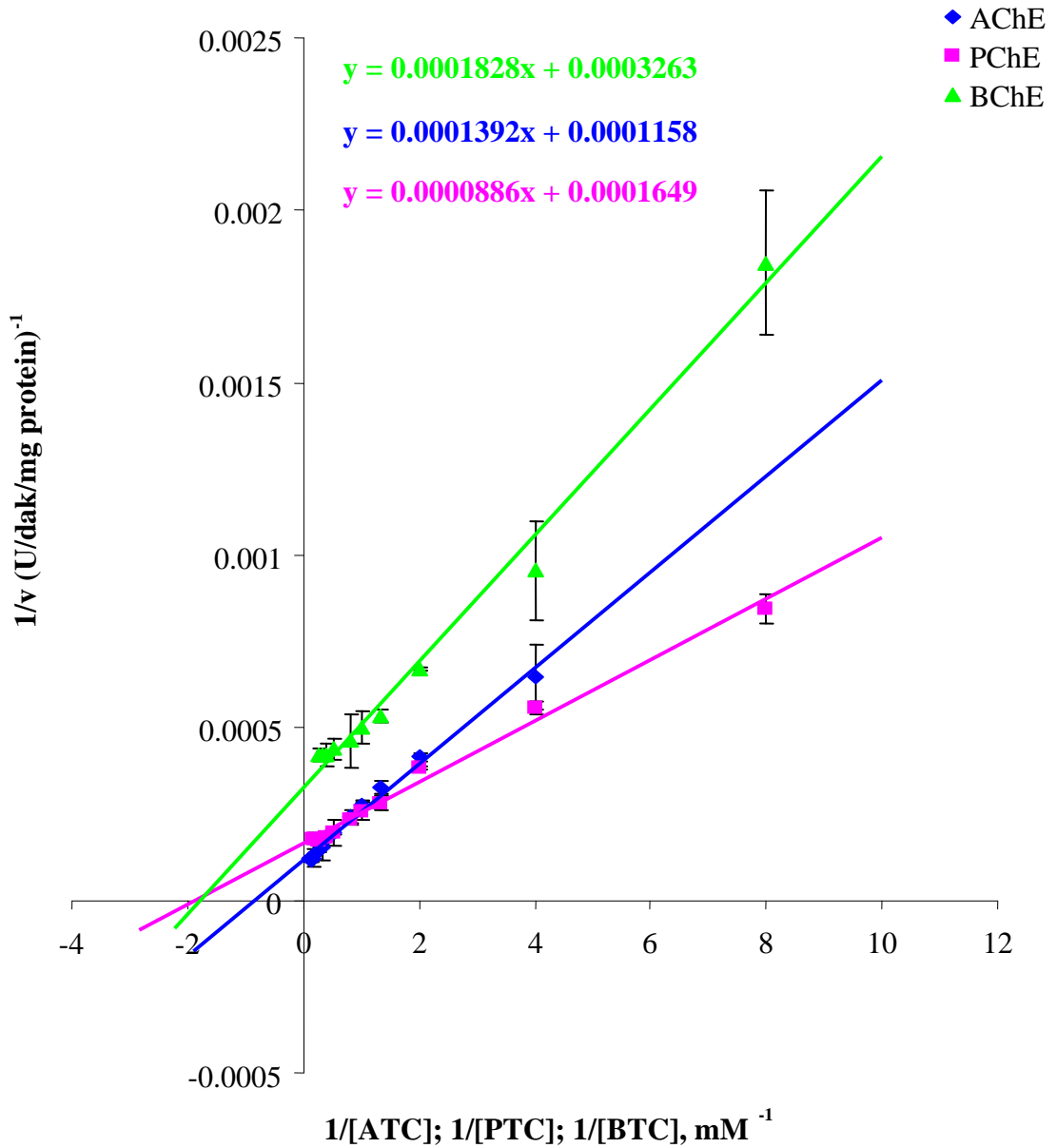


Şekil 3.5 *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE substrat saturasyon grafiği

3.3.5.2. PTC konsantrasyonunun etkisinin tayini

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,125 mM ile 6,25 mM arasında değişen PTC konsantrasyonlarında PChE aktivitesi tespit edildi. 5 mM substrat konsantrasyonuna kadar aktivitenin artma gösterdiği belirlendi. *L. profundicola* sitozolik PChE aktivitesine PTC konsantrasyonunun etkisi ve Lineweaver-Burk grafiği Şekil 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. K_m değeri 0,537 mM; V_{max} değeri 6064 U/dak/mg protein olarak bulundu. V_{max} ve K_m değerleri Excel programı kullanılarak hesaplandı.

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,125 mM ile 6,25 mM arasında değişen PTC konsantrasyonları ile inhibisyon gerçekleştirildi. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.



Şekil 3.6 *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE Lineweaver-Burk substrat saturasyon grafiği

3.3.5.3. BTC konsantrasyonunun etkisinin tayini

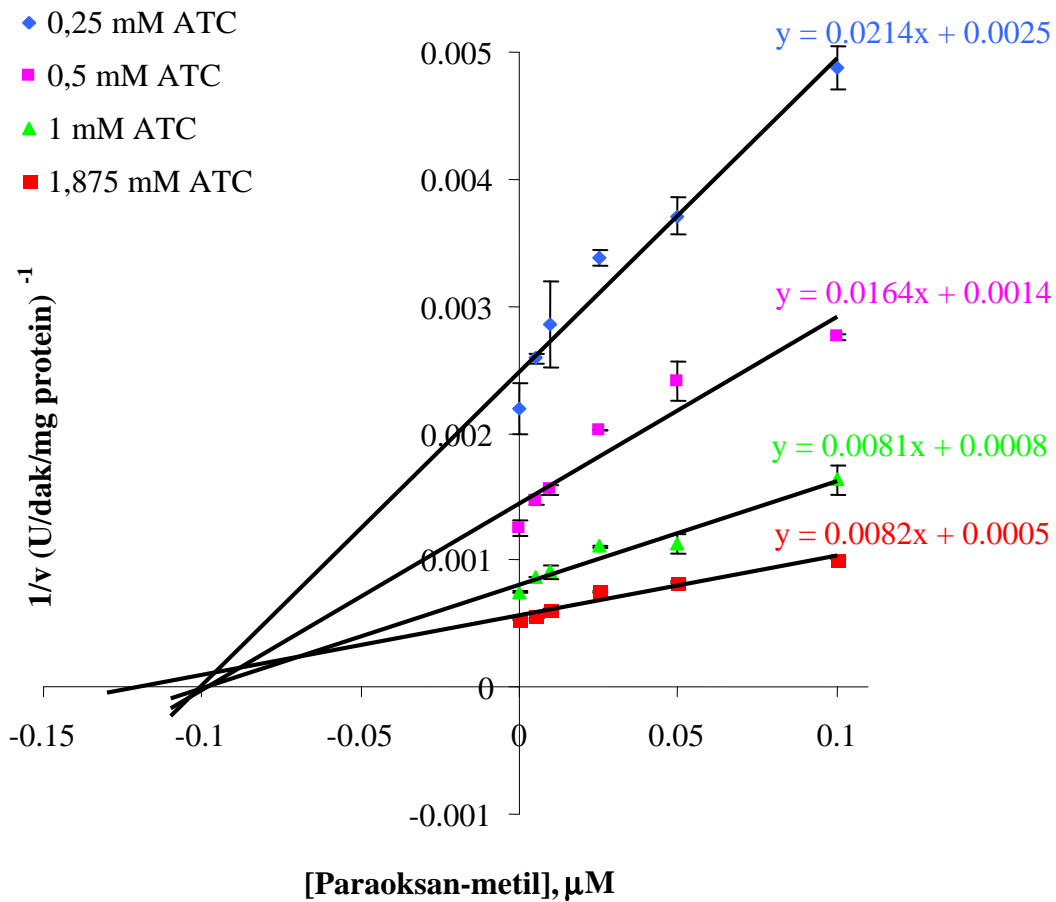
Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,125 mM ile 3,75 mM arasında değişen BTC konsantrasyonlarında BChE aktivitesi tespit edildi. 2,5 mM substrat konsantrasyonuna kadar aktivitenin artma gösterdiği belirlendi. *L. profundicola* sitozolik BChE aktivitesine BTC konsantrasyonunun etkisi ve Lineweaver-Burk grafiği ve Şekil 3.5 ve 3.6'da verilmiştir. K_m değeri 0,560 mM; V_{max} değeri 3065 U/dak/mg protein olarak bulundu. V_{max} ve K_m değerleri Excel programı kullanılarak hesaplandı.

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,125 mM ile 3,75 mM arasında değişen BTC konsantrasyonları ile inhibisyon gerçekleştirildi. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.3.6. *L. profundicola* ChE aktivitesi üzerine *in vitro* paraokson-metil inhibisyonu tayini

3.3.6.1. AChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,005 μM ile 0,1 μM arasında değişen paraokson-metil konsantrasyonlarında AChE inhibisyonu tespit edildi. 0,005 μM 'dan 0,1 μM paraokson-metil konsantrasyonuna doğru inhibisyonun gittikçe arttığı gözlemlendi AChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu net olarak tesbit edilememesine karşın karışık tip inhibisyona uygun bulundu. Paraokson-metil'in *L. profundicola* sitozolik AChE aktivitesi üzerine inhibisyonu Şekil 3.7'de verilmiştir.

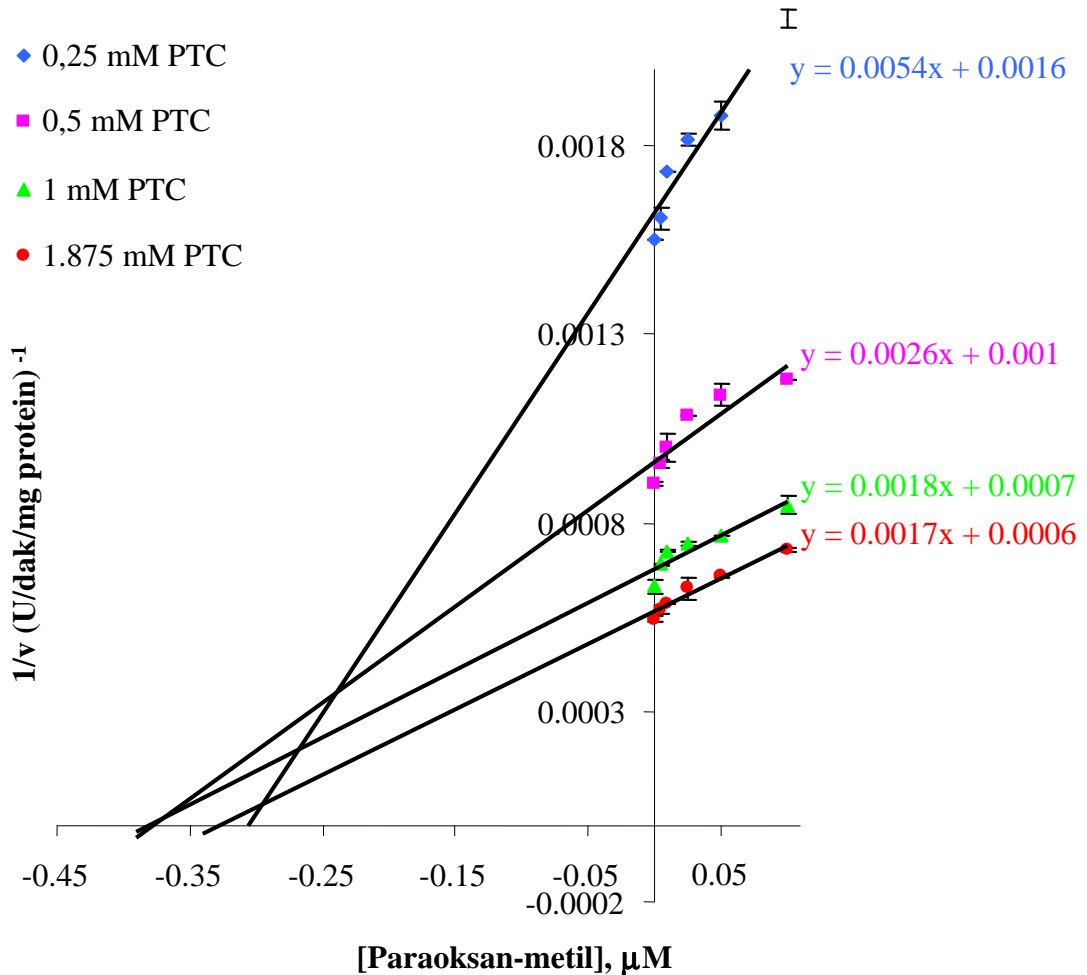


Şekil 3.7 *L. profundicola* sitozolik AChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dixon plot grafiği

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,005 μM ile 0,1 μM arasında değişen paraokson-metil konsantrasyonları ile 4 farklı ATC konsantrasyonunda artan inhibisyon saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.3.6.2. PChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,005 μM ile 0,1 μM arasında değişen paraokson-metil konsantrasyonlarında PChE inhibisyonu tespit edildi. 0,005 μM 'dan 0,1 μM paraokson-metil konsantrasyonuna doğru inhibisyonun gittikçe arttığı gözlemlendi PChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu net olarak tesbit edilememesine karşın karışık tip inhibisyona uygun bulundu. Paraokson-metil'in *L. profundicola* sitozolik PChE aktivitesi üzerine inhibisyonu Şekil 3.8'de verilmiştir.

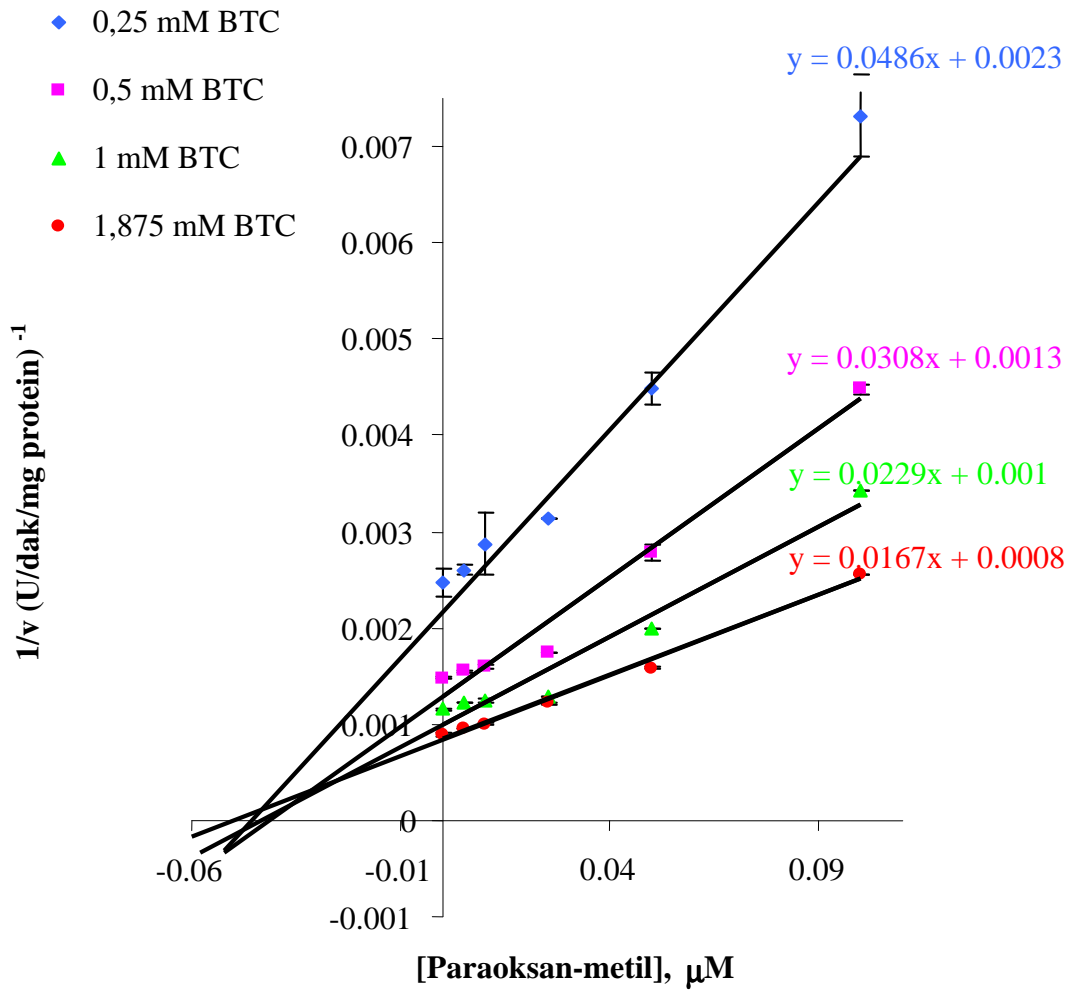


Şekil 3.8 *L. profundicola* sitozolik PChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dixon plot grafiği

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,005 μM ile 0,1 μM arasında değişen paraokson-metil konsantrasyonları ile 4 farklı PTC konsantrasyonunda artan inhibisyon saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.3.6.3. BChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu

Materyal ve Metotta tanımladığı gibi 0,005 μM ile 0,1 μM arasında değişen Paraokson-metil konsantrasyonlarında BChE inhibisyonu tespit edildi. 0,005 μM 'dan 0,1 μM paraokson-metil konsantrasyonuna doğru inhibisyonun gittikçe arttığı gözlemlendi BChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonu net olarak tesbit edilememesine karşın karışık tip inhibisyona uygun bulundu. Paraokson-metil'in *L. profundicola* sitozolik BChE aktivitesi üzerine inhibisyonu Şekil 3.9'da verilmiştir.



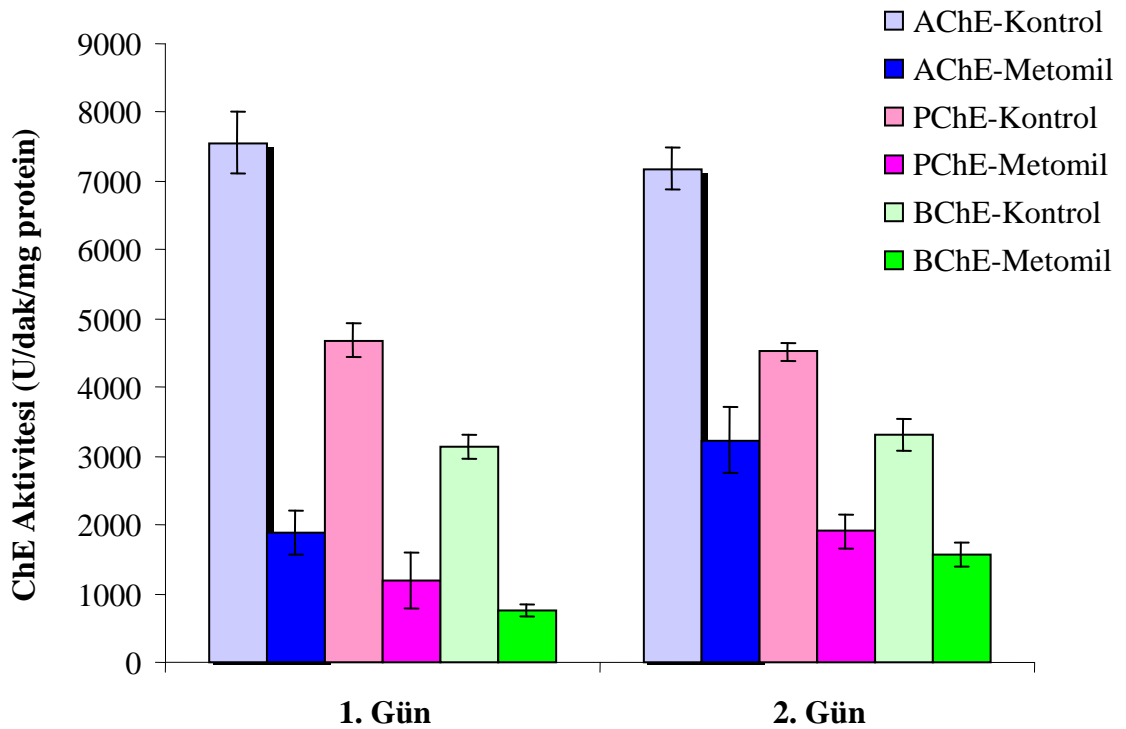
Şekil 3.9 *L. profundicola* sitozolik BChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyonunun Dixon plot grafiği

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,005 μ M ile 0,1 μ M arasında değişen paraokson-metil konsantrasyonları ile 4 farklı BTC konsantrasyonunda artan inhibisyon saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.4. *L. profundicola* ChE Aktivitesi Üzerine *in vivo* İnsektisit ve Petrokimyasal Atık Etkisinin Tayini

3.4.1. Metomil etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,1 gr/lt metomil'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivite değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edildi. Kontrol grupla karşılaştırıldığında her üç substrat içinde 1. gün daha yüksek inhibisyon gözlemlendi. İnhibisyonun 2. günde azaldığı tespit edildi. Metomil'in *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 3.10'da verilmiştir.



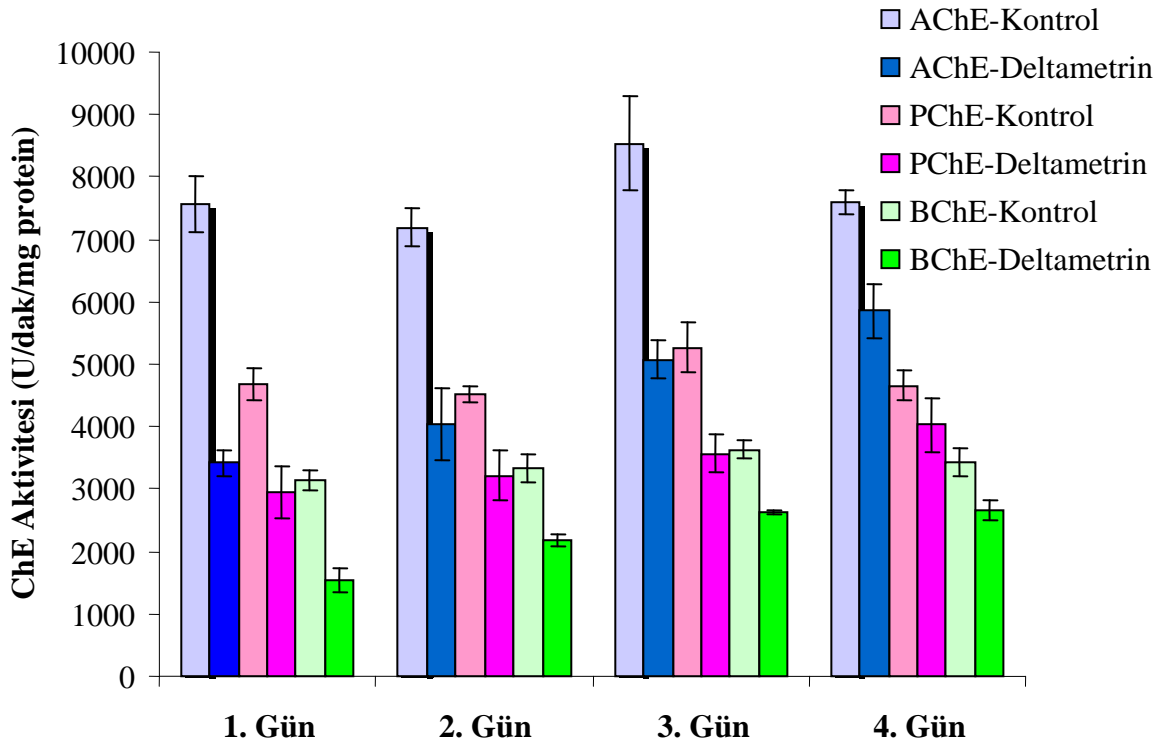
Şekil 3.10 Metomil'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 0,1 gr/lt metomil'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri arasında metomil'e maruz bırakılan bireylerde kontrollere oranla ve günler arasında ****P<0,000 seviyesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.10).

3.4.2. Deltametrin etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 200 µl/lt deltametrin'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivite değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edildi. Kontrol grupla karşılaştırıldığında her üç substrat içinde 1. gün daha yüksek inhibisyon gözlemlendi. İnhibisyonun 2., 3. ve 4. günlerinde gittikçe azaldığı tespit edildi. Deltametrin'in *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 3.11'de verilmiştir.



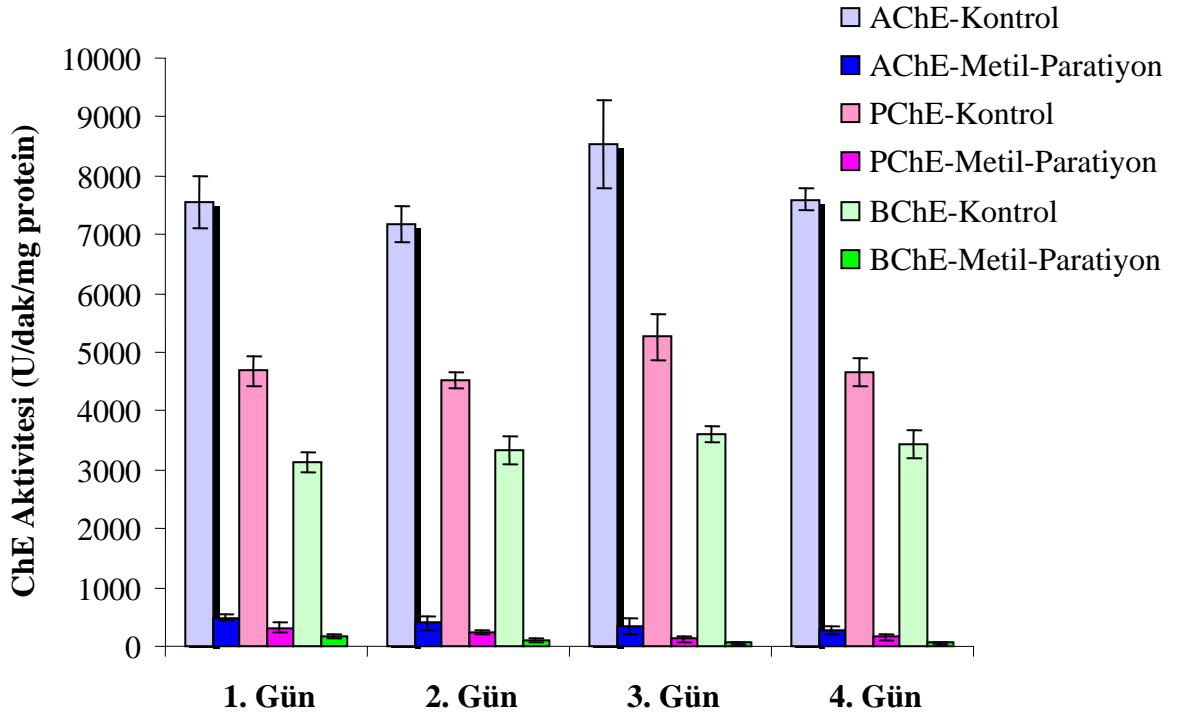
Şekil 3.11 Deltametrin'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 200 µl/lt deltametrin'e maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri arasında deltametrin'e maruz bırakılan bireylerde kontrollere oranla ve günler arasında ****P<0,000 seviyesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir (Bkz. Şekil 3.11).

3.4.3. Metil-paratasyon etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 100 µl/lt metil-paratasyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivite değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edildi. Kontrol grupla karşılaştırıldığında her üç substrat içinde yüksek derecede inhibisyon gözlendi. İnhibisyonun 1. günden 4. güne gittikçe arttığı tespit edildi. Metil-paratasyon'un *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 3.12'de verilmiştir.



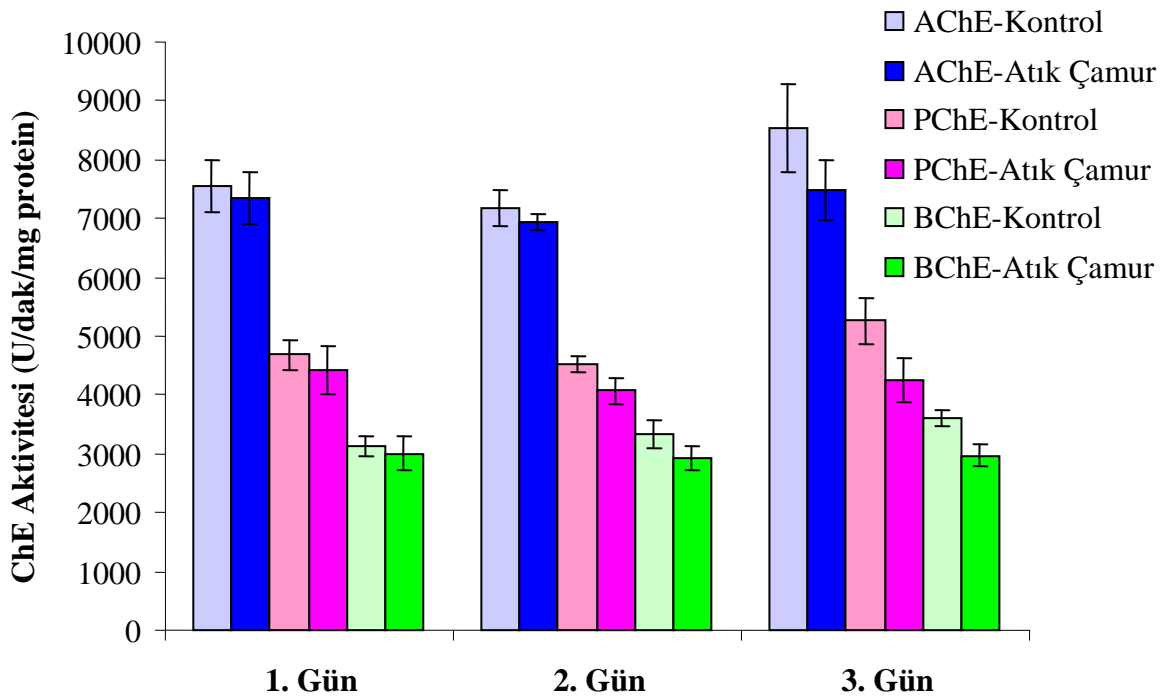
Şekil 3.12 Metil-paratasyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 100 µl/lt metil-paratyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri arasında metil-paratyon'a maruz bırakılan bireylerde kontrollere oranla ****P<0,000 seviyesinde anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca, AChE ve PChE aktivitelerinde günler arasında ****P<0,000 seviyesinde farklılık gözlenirken BChE aktivitesinde bir fark gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.12).

3.4.4. Atık çamur etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 1:1 seyreltilmiş atık çamura maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivite değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edildi. Atık çamurun *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 3.13'te verilmiştir.



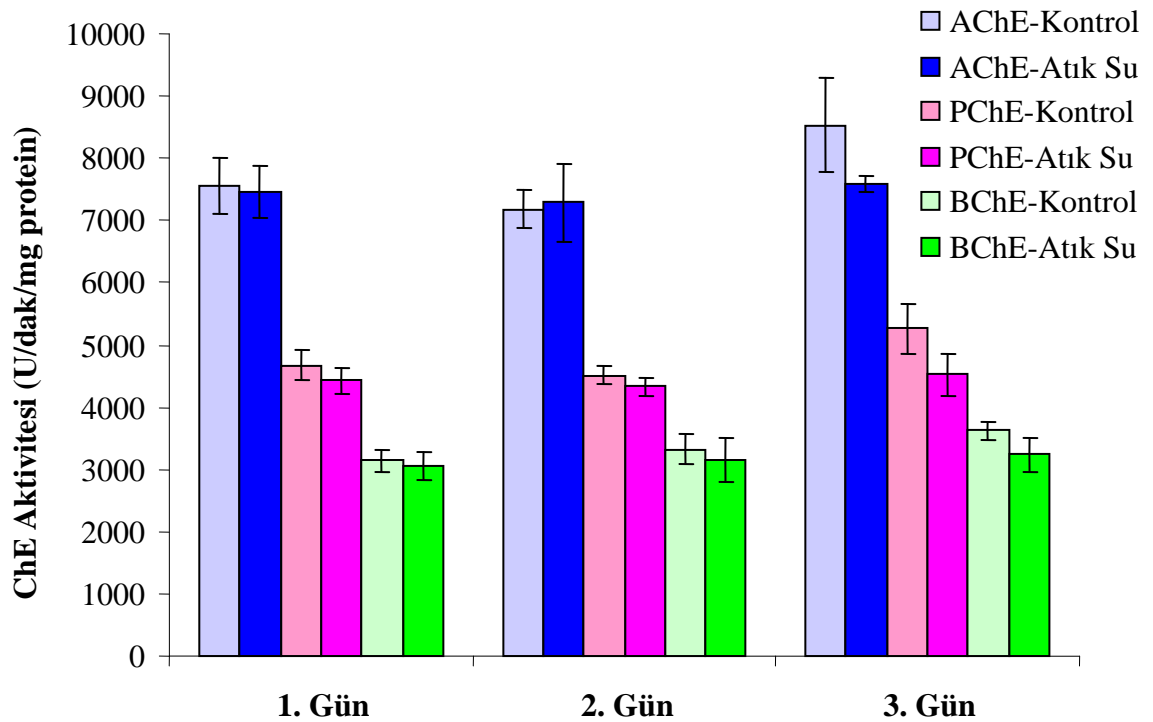
Şekil 3.13 Atık çamura maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 1:1 oranında seyreltilmiş atık çamura maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri arasında atık çamura maruz bırakılan bireylerde ve günler arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bkz. Şekil 3.13).

3.4.5. Atık su etkisi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 1:1 oranında seyreltilmiş atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivite değişimi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edildi. Kontrol grupla karşılaştırıldığında her üç substrat içinde inhibisyon gözlenmedi. Atık suyun *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri üzerine etkisi Şekil 3.14'te verilmiştir.



Şekil 3.14 Atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri değişimi

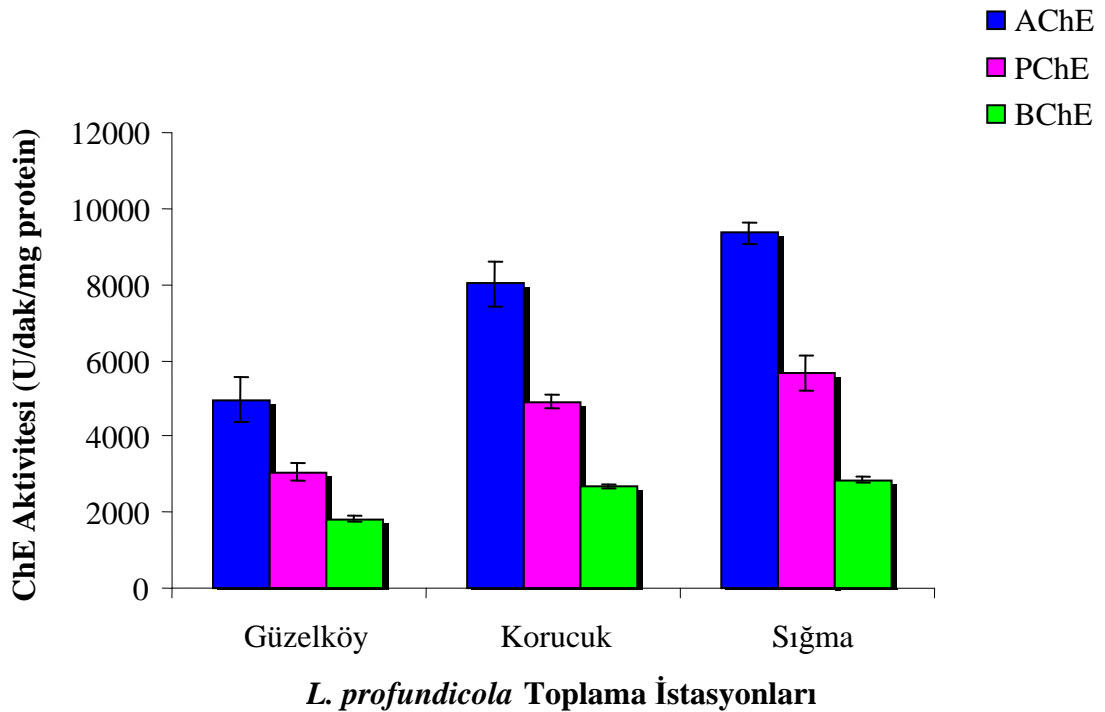
Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi 1:1 oranında seyreltilmiş atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri saptandı. Her

bir nokta iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu *L. profundicola* sitozolik AChE, PChE ve BChE aktiviteleri arasında atık suya maruz bırakılan bireylerde ve günler arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bkz. Şekil 3.14).

3.5. Çürüksu Çayı Üzerinde Belirlenen İstasyonlardan Toplanan *L. profundicola* Bireylerinde ChE Aktivite Değişimleri

Çürüksu Çayı üzerinde, organik kirlilik derecesine göre belirlenen Güzelköy, Korucuk ve Sığma istasyonlarından toplanan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktiviteleri ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak saptandı. AChE, PChE ve BChE aktivitelerinin tarımsal ve endüstriyel organik kirlilik varlığı düşünülen Güzelköy istasyonundan Sığma istasyonuna gidildikçe azaldığı tespit edildi. Üç farklı istasyondan toplanan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri Şekil 3.15’de verilmiştir.

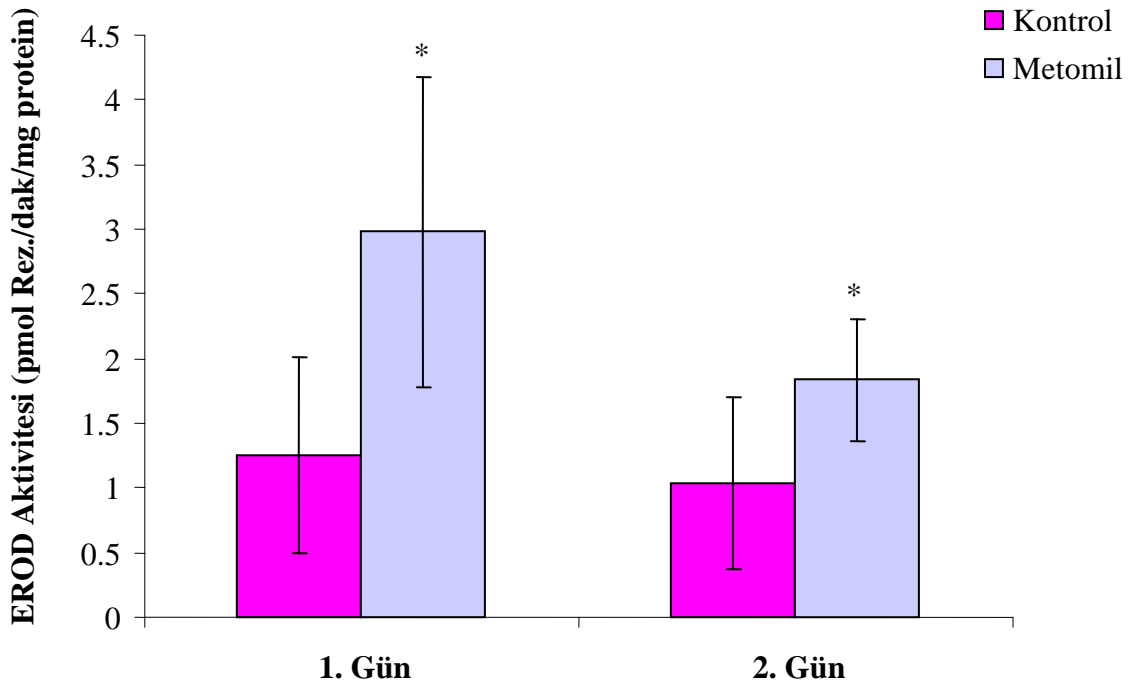


Şekil 3.15 Farklı bölgelerden toplanan *L. profundicola* bireylerinde ChE aktiviteleri

Yapılan One Way Anova ve Two Sample T Testi analizleri sonucu Güzelköy, Korucuk ve Sığma istasyonlarından toplanan *L. profundicola* sitozolik ChE aktiviteleri arasında $P < 0,000$ seviyelerinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Sitozolik AChE aktiviteleri, Güzelköy-Sığma ve Güzelköy-Korucuk istasyonları arasında $P < 0,000$, Korucuk-Sığma istasyonları arasında $P < 0,005$; sitozolik PChE aktiviteleri, Güzelköy-Sığma ve Güzelköy-Korucuk istasyonları arasında $P < 0,000$, Korucuk-Sığma istasyonları arasında $P < 0,058$; sitozolik BChE aktiviteleri ise Güzelköy-Sığma ve Güzelköy-Korucuk istasyonları arasında $P < 0,000$, Korucuk-Sığma istasyonları arasında $P < 0,014$ bulunmuştur (Bkz. Şekil 3.15).

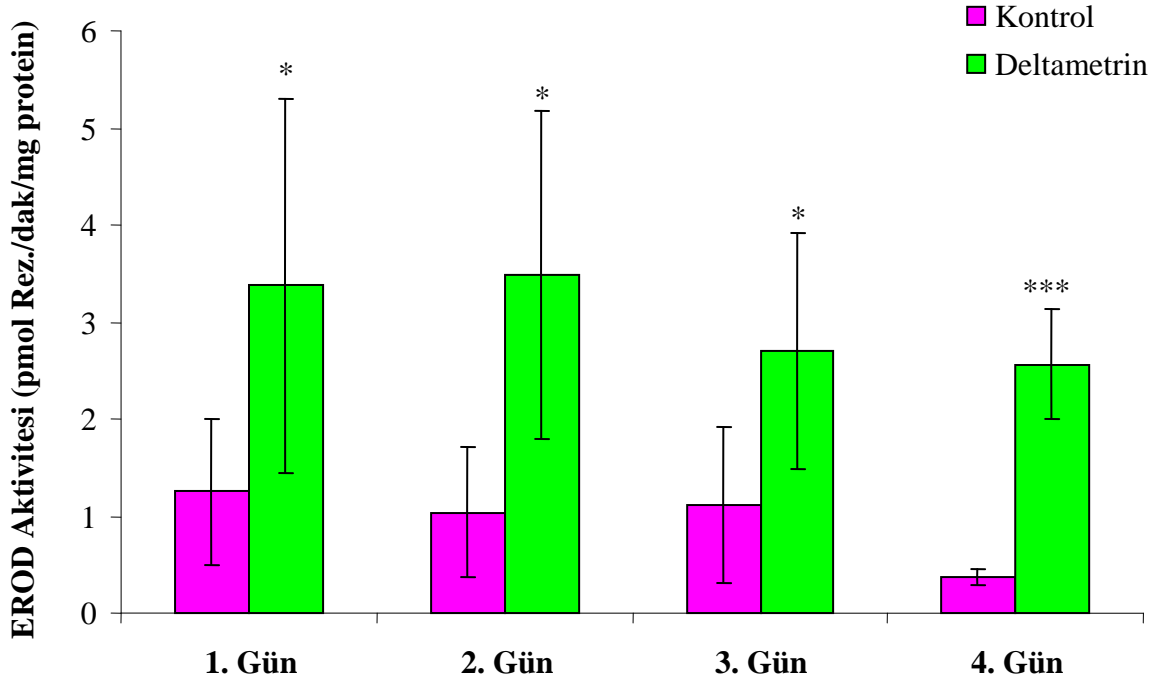
3.6. *L. profundicola* Mikrozomal EROD Aktiviteleri

Metomil, deltametrin, metil-paratiyon, atık çamur ve atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomlarında sitokrom P4501A1 tarafından katalize edilen EROD, 7-etoksirezorufin substratı kullanılarak Materyal ve Metot'ta tanımlandığı gibi Burke ve Mayer (1974) metoduna dayanarak optimize edilen Arınç ve Sen (1994)'e göre tespit edildi. EROD aktiviteleri Şekil 3.16, 17, 18, 19, 20'de verilmiştir.



Şekil 3.16 Metomil'e maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomlarında EROD aktiviteleri

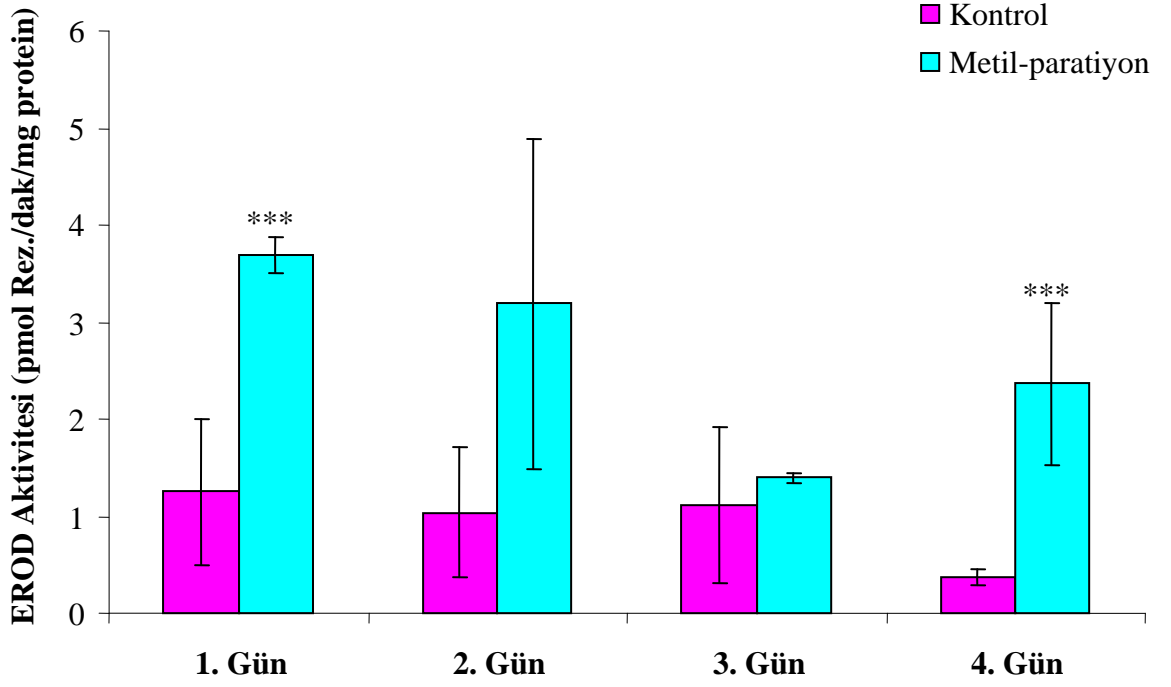
Yapılan One Way Anova analizleri sonucu kontrollere oranla metomil'e maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomal EROD aktiviteleeri arasında *P<0,05 seviyesinde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. Günler arası mikrozomal EROD aktiviteleerinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Şekil 3.16).



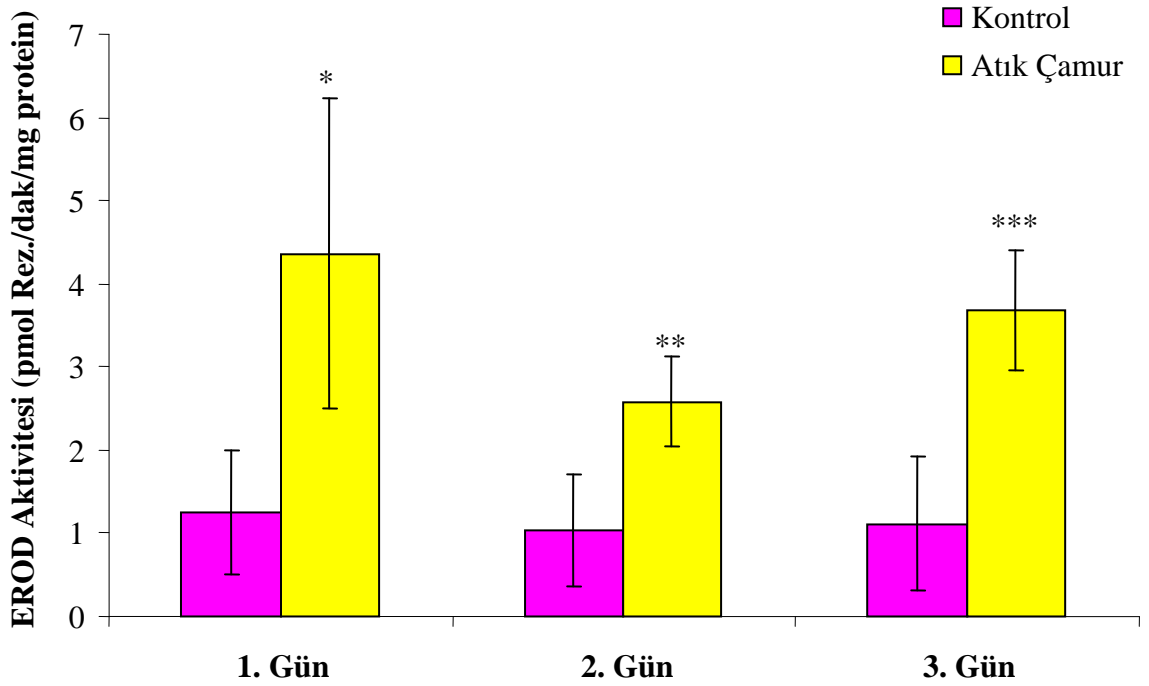
Şekil 3.17 Deltametrin'e maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozoamlarında EROD aktiviteleeri

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu kontrollere oranla deltametrin'e maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomal EROD aktiviteleeri arasında *P<0,05 ve ***P<0,002 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Günler arasındaki EROD aktiviteleerinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Şekil 3.17).

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu kontrollere oranla metil-paratasyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomal EROD aktiviteleeri arasında ***P<0,002 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Bkz Şekil 3.18).

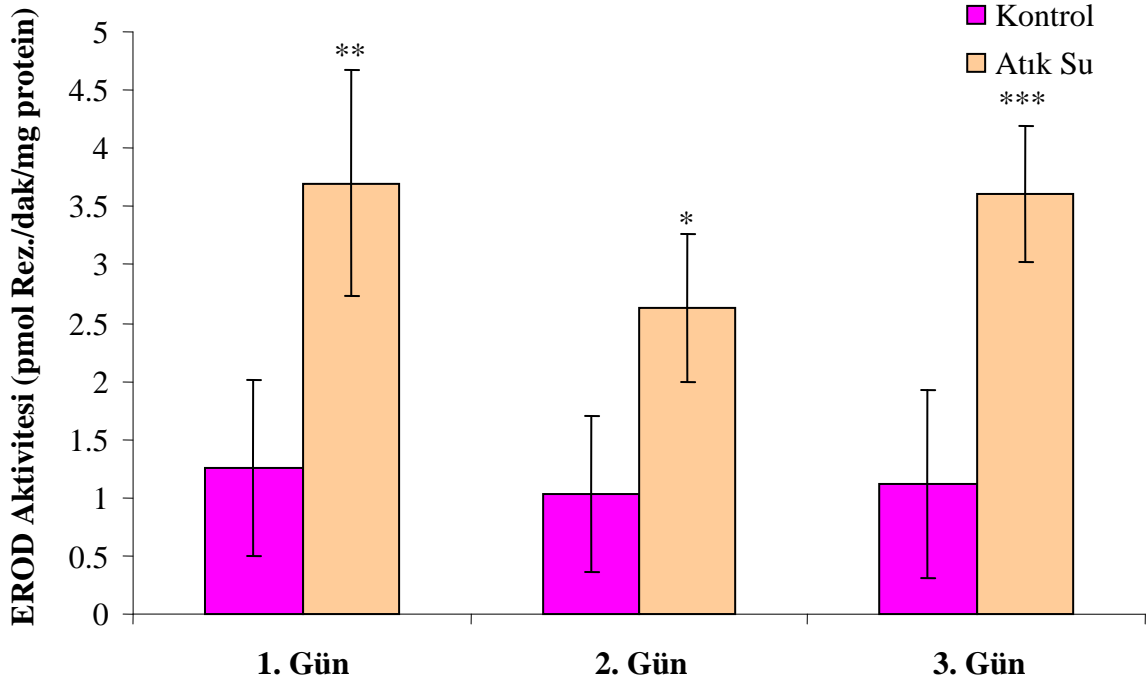


Şekil 3.18 Metil-paratiyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozoamlarında EROD aktiviteleri



Şekil 3.19 Atık çamura maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozoamlarında EROD aktiviteleri

Yapılan One Way Anova analizleri sonucu kontrollere oranla atık çamura maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomal EROD aktiviteleri arasında * $P<0,05$, * $P<0,005$ ve *** $P<0,002$ seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Günler arasındaki EROD aktivitelerinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Şekil 3.19).



Şekil 3.20 Atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomlarında EROD aktiviteleri

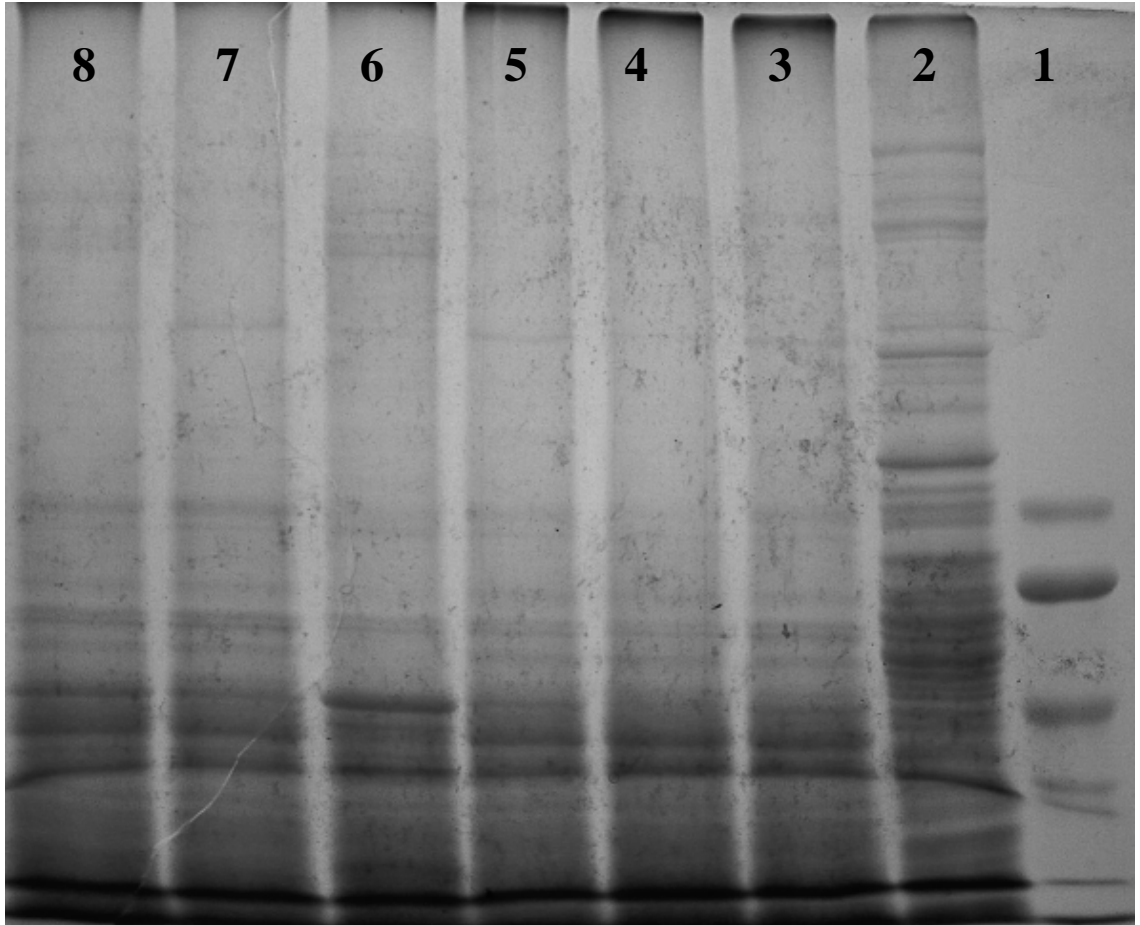
Yapılan One Way Anova analizleri sonucu kontrollere oranla atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomal EROD aktiviteleri arasında * $P<0,05$, * $P<0,005$ ve *** $P<0,002$ seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklar bulunmuştur. Günler arasındaki EROD aktivitelerinde ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Bkz. Şekil 3.20).

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi metomil, deltametrin, metil-paratyon, atık çamur ve atık suya maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozomlarında EROD aktiviteleri saptandı. Her bir nokta en az iki set deney ve her bir deney en az bir çift ölçümlerin ortalamaları alınarak verilmiştir.

3.7. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve Western Blot Analizleri

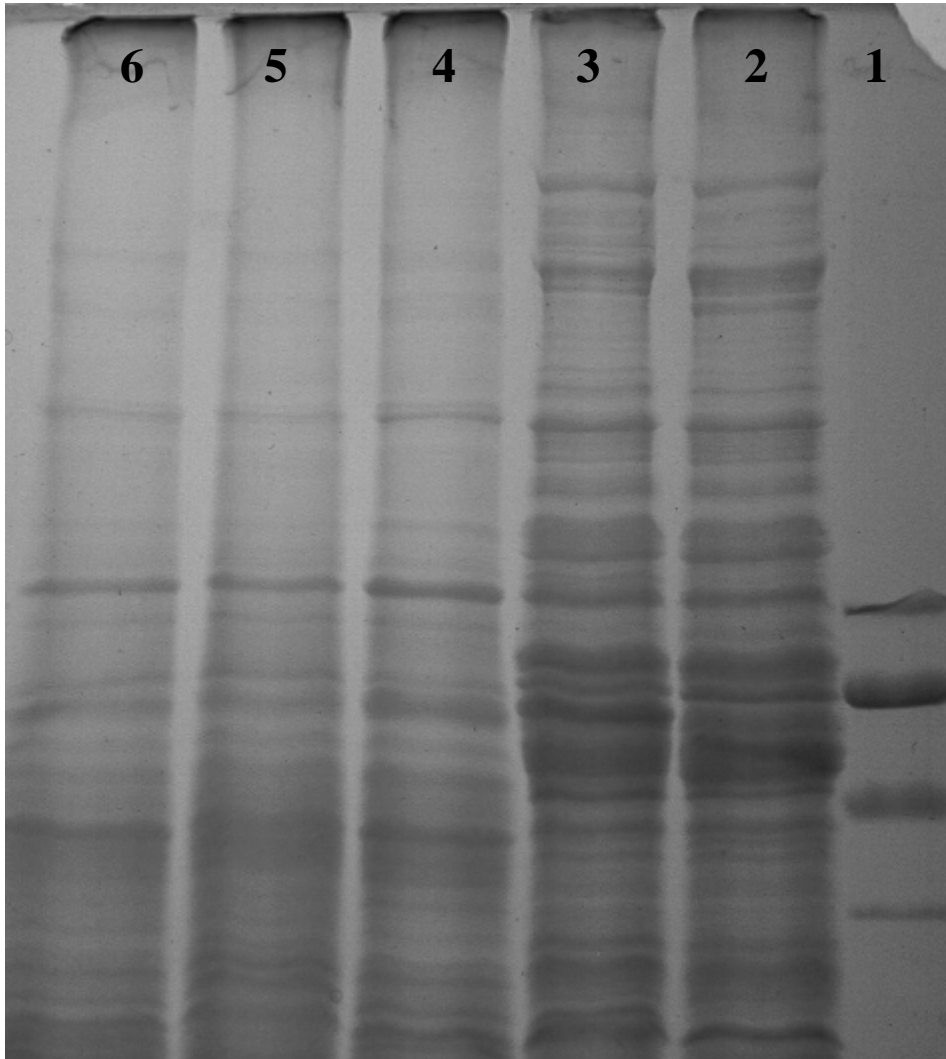
Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi yapılan SDS-poliakrilamid jel elektrofrez ve Western blot analizlerinde jel kuyularına yüklenen numunelerin kodlamalarıyla, elde edilen jel ve membranların görüntüleri aşağıda verilmiştir.

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi yapılan SDS-poliakrilamid jel elektrofrezinde; Kuyu 1 Standart Proteinler [BSA (M_r 66 000), katalaz (M_r 60 000), yumurta albumini (M_r 45 000), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (M_r 36 000) ve sitokrom c (M_r 11 700)]; kuyu 2 3-MC-Rat; kuyu 3 *L. profundicola*-kontrol; kuyu 4 *L. profundicola*-atık çamur; kuyu 5 *L. profundicola*-atık su; kuyu 6 *L. profundicola*-deltametrin; kuyu 7 *L. profundicola*-metomil; kuyu 8 *L. profundicola*-metil-paratyon mikrozomlarını içermektedir. Elde edilen SDS-poliakrilamid jelinin görüntüsü Şekil 3.21'de verilmiştir.



Şekil 3.21 Metomil, deltametrin, metil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola*'lar ile 3-MC-Rat mikrozomlarında SDS-poliakrilamid jel elektrofrez

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi, anti-Rat CYP1A1 IgG ve anti-Rat CYP4A IgG kullanılarak yapılan Western blot analizleri için uygulanan SDS-poliakrilamid jel elektroforezinde; Kuyu 1 Standart Proteinler [BSA (M_r 66 000), katalaz (M_r 60 000), yumurta albumini (M_r 45 000), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (M_r 36 000) ve sitokrom c (M_r 11 700)]; kuyu 2 kontrol Rat; kuyu 3 3-MC-Rat; kuyu 4 kontrol *L. profundicola*; kuyu 5 *L. profundicola*-atık çamur; kuyu 6 *L. profundicola*-atık su mikrozomlarını içermektedir. Şekil 3.22’de görüntüsü verilen SDS-poliakrilamid jelinin benzeri Western blot analizleri için kullanılmıştır.



Şekil 3.22 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola*'lar ile rat mikrozomlarında SDS-poliakrilamid jel elektroforezi

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi Nitroselüloz membran anti-Rat CYP1A1 IgG ve anti-Rat CYP4A IgG ile oda sıcaklığında 2 sa süreyle inkübe edildi, daha sonra anti-Rabbit IgG-ALP ile konjuge olan ikincil antikor ile 1 sa inkübe edildi. Spesifik olarak

bağlanan antikorların görüntülenmesi Materyal ve Metotta tanımlanan substrat solüsyonunda blot'ın inkübasyonu sonucu yapıldı.

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi anti-Rat CYP1A1 IgG kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde, **1** Standart Proteinler [BSA (M_r 66 000), katalaz (M_r 60 000), yumurta albumini (M_r 45 000), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (M_r 36 000) ve sitokrom c (M_r 11 700)]; **2** kontrol Rat; **3** 3-MC-Rat; **4** kontrol *L. profundicola*; **5** *L. profundicola*-atık çamur; **6** *L. profundicola*-atık su mikrozoamlarının yüklendiği kuyuları göstermektedir. Anti-Rat CYP1A1 IgG kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde 3-MC-Rat mikrozoamlarını içeren 3 nolu kuyucukta bir bant gözlenirken kontrol Rat ve kontrol *L. profundicola* ile atık su ve çamura maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozoamlarını içeren diğer kuyucuklarda herhangi bir bant gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.23).



Şekil 3.23 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola*'lar ile rat mikrozoamlarında sitokrom P4501A1'in poliklonal anti-Rat CYP1A1 IgG kullanılarak immünoblot analizleri

Materyal ve Metotta tanımlandığı gibi anti-Rat CYP4A IgG kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde, **1** Standart Proteinler [BSA (M_r 66 000), katalaz (M_r 60 000), yumurta albumini (M_r 45 000), gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (M_r 36 000) ve sitokrom c (M_r 11 700)]; **2** kontrol Rat; **3** 3-MC-Rat; **4** kontrol *L. profundicola*; **5** *L.*

profundicola-atık çamur; **6** *L. profundicola*-atık su mikrozoomlarının yüklendiği kuyuları göstermektedir. Anti-Rat CYP4A IgG kullanılarak yapılan Western blot analizlerinde 3-MC-Rat, kontrol Rat ve kontrol *L. profundicola* ile atık su ve çamura maruz bırakılan *L. profundicola* mikrozoomlarını içeren kuyucuklarda herhangi bir bant gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.24).



Şekil 3.24 Petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola*'lar ile rat mikrozoomlarında sitokrom P4504A'nın poliklonal anti-Rat CYP4A1,2,3 IgG kullanılarak immünoblot analizleri

4. TARTIŞMA

Her geçen gün artan sanayi kuruluşlarının endüstriyel atık sularının ve evsel atık suların deniz, göl ya da nehirlerimize verilmesi, bitki zararlıları ile mücadelede kullanılan ve canlı organizmalar üzerinde toksik ve karsinojenik etkiye sahip insektisitler, herbisitler gibi çeşitli pestisitlerin kullanımının artması ile artan çevresel kirlilik birçok canlı türünün yaşamını tehlikeye sokmaktadır. Yirmibirinci yüzyılın en büyük sorunlarından biri olan kullanılabilir su kaynaklarının tüketiminin artmasına rağmen, tüm canlıların yaşamı için zorunlu su kaynaklarının akuatik alanlara deşarj edilen atık sular, içerdikleri ağır metaller, toksik bileşikler, azotlu ve karbonlu organik ve inorganik bileşikler ile kirlenmesi bazı canlı türlerinin ölümüne, toleranslı türlerde ise fizyolojik ve morfolojik değişimlere neden olmaktadır. Ayrıca tatlı su sistemleri, mahsulü koruma amaçlı yapılan kasıtlı uygulamalar ve böceklerin kontrolü ya da dökülme, arazi drenajı, sürüklenme gibi kasıtsız uygulamalarla insektisitlerce kirlenmektedir (Day ve Scott 1990, Crane vd 1995, Crane vd 2002). Böylece, nehir ve göllerde yaşayan akuatik invertebratlar subletalden letale değişen çeşitli insektisit konsantrasyonlarına maruz kalabilmektedirler (Crane vd 2002). Yüksek insektisit konsantrasyonları sudaki invertebrat komunitelerinin etkilenmesine neden olmaktadır (Maycock vd 2003).

Su, sediment ya da uygun biyomarkör organizmalar kullanılarak geliştirilen çeşitli metodlarla kirliliğin boyutları saptanabilmektedir. Özellikle enzim aktivite ölçümleri ile düşük seviyelerdeki kirliliği saptamak için kullanılan biyomarkörler, akuatik ekosistemlerin ekolojik risk değerlendirmelerinde gittikçe daha fazla kullanılmaktadır. Bu biyomarkörler, pestisitler gibi ksenobiyotiklerce neden olunan etkileri ve maruziyet oranını saptamak için potansiyel öneme sahiptirler. Böylece, biyolojik organizasyonlarda yüksek seviyelerdeki potansiyel zarar etkileri için erken tespit yapılmış olur (McCarthy ve Shugart 1990, Callaghan vd 2002). Çeşitli tipte çevresel kirleticilere maruz kalan canlılarda, özellikle böceklerde, direnç mekanizması ile ilgili enzimlerden Esterazlar, Glutathion-S-Transferazlar, P450 Monooksijenazlar ve Hidrolazlar en çok kullanılanlarıdır.

Esterazlardan ester ve amid-bağı içeren geniş çeşitlilikteki ilaçların hidrolizini katalizleyen CaE ve ChE'lar OP insektisitlerinin okson metabolitleri ile tersinmez olarak inhibe edilmektedirler (Sato 2005). Karboksilesterazlar, piretroid ve organofosfat bileşikleri daha az toksik metabolitlere hidrolize ederek piretroid toksisitesini redüklemektedirler (Abernathy ve Casida 1973, Wheelock vd 2004, Wheelock vd 2005). OP insektisitler en önemli toksikolojik etkilerini esterazların merkezi sinir sisteminde geri dönüşümsüz fosforilasyonu ile sağlamaktadırlar (Aldridge ve Reiner 1972; WHO 1986, Sogorb ve Vilanova 2002) ve ChE aktivitesi ya sucul çevrelerin bu bileşiklerce kirletildiğine ya da balıkların bu bileşiklere maruz kaldığına dair bir biyoindikatör olarak kullanılmaktadır (Zinkl vd 1991, Chuiko vd 2003). AChE, invertebrat zararlıların kontrolü için kullanılan organofosfatlar (OP) ve karbamatlar gibi nörotoksik pestisitlerin primer hedefidir (Hassal 1990, Callaghan vd 2002, Frasco vd 2006). OP'lar nörotransmitter asetilkolini hidrolize eden AChE'nin aktif bölgesine (Aldridge 1950, Aldridge ve Rainer 1972, Murphy 1986, Fukuto 1990, Rachinsky vd 1990, Sussman vd 1991, Kardos ve Sultatos 2000, Chandrasekara ve Pathiratne 2006) aktif okson metabolitleri ile (klorofiyrifos-okson, paraokson gibi) tersinmez bir şekilde bağlanmaktadır (Habig ve DiGiulio 1991, Callaghan vd 2001, Callaghan vd 2002, Sogorb ve Vilanova 2002, Cheng vd 2004, Kousba vd 2004, Wang vd 2004). Malatyon gibi fosforoditiyoatlar ya da klorfiyrifos ve metil-paratyon gibi fosforotiyoatlar sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar (sülfoksidasyon) tarafından biyoaktif edilirler ve oluşan okson analogu daha potansiyel AChE inhibitörüdür (Chambers 1992). Nörotoksik bileşiklerce AChE inhibisyonu pestisitlere maruziyet ve bunların etkileri için bir biyomarkör olarak doğada ve insanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Thompson 1991, Crane vd 1995, Carr ve Chambers 1996, Scaps vd 1997, Dembélé vd 2000, Kirby vd 2000, Kheir vd 2001, Crane vd 2002, de la Torre vd 2002, Forget vd 2003, Frasco vd 2006). Özellikle balıklarda AChE aktivitesi inhibisyonu bir çok çalışmada OP ve karbamat pestisit maruziyetinin tespitinde kullanılmaktadır (Zinkl vd 1987, Galgani vd 1992, Beyers ve Sikoski 1994, Lionetto vd 2003). Çeşitli invertebratlarda da AChE aktivite ölçümleri OP maruziyetinin saptanmasında bir biyomarkör olarak kullanılmıştır (Karnak ve Collins 1974, Detra ve Collins 1986, Day ve Scott 1990, Crane vd 1995, Ibrahim vd 1998, Sturm ve Hansen 1999, Callaghan vd 2001).

ChE özelliklerinin türden türe farklılık göstermesi nedeni ile türlerin bir biyomarkör olarak kullanılabilirliği için öncelikli olarak türlerde bulunan enzimin tipinin karakterize edilmesi önemlidir.

Yapılan çalışmalarımız sonucunda, Büyük Menderes Nehri'nin bir kolu olan Çürüksü Çay'ı üzerinde belirlenen çeşitli istasyonlardan toplanan oligoet *Limnodrilus profundicola*'larda sitozolik kolinesteraz (ChE) aktivitesi, asetiltiyokolin (ATC), propiyoniltiyokolin (PTC) ve butiriltiyokolin (BTC) substratları kullanılarak karakterize edilmiştir. Belirlenen optimum protein konsantrasyonu, pH, sıcaklık, substrat konsantrasyonu ile Lineweaver-Burk grafiği kullanılarak belirlenen V_{max} ve K_m değerleri ve çalışılan *in vitro* paraokson-metil inhibisyon kinetikleri Tablo 4.1'de verilmektedir.

Tablo 4.1 Çürüksü Çayı üzerinden toplanan *L. profundicola* bireylerinde sitozolik ChE karakterizasyonu verileri ve *in vitro* paraokson-metil inhibisyonu

Enzim	Protein Konsantrasyonu (μg)	Optimum pH	Optimum sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Substrat Konsantrasyonu (mM)	K_m (mM)	V_{max} (U/dak/mg protein)	Paraokson-metil inhibisyon tipi
AChE	50	8,50	35	7,5	1,202	8636	Karışık tip
PChE	50	8,50	35	5	0,537	6064	Karışık tip
BChE	100	8,50	35	2,5	0,560	3065	Karışık tip

Bizim çalışmalarımıza benzer şekilde farklı invertebrat türleri ile farklı ChE substratları konsantrasyonları ile yapılan ChE karakterizasyonu çalışmalarında çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Bunlara göre, Bellanger vd (1998)'de invertebrat cephalopod *Sepia officinalis*'te beyin ChE aktivite ölçümlerinde 0,3 mM ATC, 1 mM BTC ve 0,3 mM PTC substrat son konsantrasyonları ile 1,5 mM DTNB ve 20 mM fosfat tamponu pH 7 içeren reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Farklı beyin bölümlerinde saptanan aktiviteler, AChE için 13,4-75,9 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein, BChE için 4-38 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein ve PChE için 11,1-50,8 $\mu\text{mol/sa/mg}$ protein olarak bulunmuştur. Talesa vd (1993a) ve Scaps vd (1996)'da ChE aktiviteleri AChE>PChE>BChE şeklinde

bulunmuştur. Bizim çalışmalarımızda da kullanılan üç ChE substratı için aktivite değerleri arasında benzer ilişki bulunmuştur. *Palaemon serratus* gözlemlerinden elde edilen saflaştırılmış numunelerde ChE aktivitelerinin çalışmada kullanılan substratlar için ATC>AβMTC>PTC şeklinde olduğu, BTC'nin ise hidrolize edilmediği bulunmuş, ATC ve AβMTC'de yüksek konsantrasyonlarda enzimatik inhibisyon gözlenmiştir (Frasco vd 2006, Maxwell vd 2006). Marcel vd (1998)'de *Drosophila melanogaster*'de asetiltiyokolin, butiriltiyokolin, propiyoniltiyokolin, asetil-β-metiltiyokolin ve *o*-nitrofenil asetat için K_{m1} ve K_{m2} değerlerini sırasıyla 2,95-84; 26-273; 6,8-441; 8,5-66 ve 61-3485 μ M olarak bulunmuştur. Rao vd (2003) yaptığı çalışmada toprak solucanı *Eisenia foetida*'da ATC substratı ile K_m 0,228 mM ve V_{max} 0,025 olarak bulunmuş ve klorfiyrifos ile inhibisyonda kompetatif inhibisyon gözlemlendiği bildirilmiştir.

Cheng vd (2004)'te *Liposcelis bostrychophila* ve *Liposcelis entomophila* böceklerinde ChE aktivite ölçümlerinde 0,1 M fosfat tamponu pH 8,0 kullanılarak 37 °C'de 30 dak inkübasyon sonrası 412 nm'de 5 dak süresince takip edilen AChE aktivitelerinde iki canlı için sırasıyla K_m 0,24 ve 0,23 mM, V_{max} ise 0.17 ve 0,16 Optik yoğunluk/mg protein/30 dak bulunmuştur. Wang vd (2004)'te ise *Liposcelis bostrychophila* ve *Liposcelis entomophila* böceklerinde ChE aktivitesi 1,5 mM ATC substratı, 1 mM DTNB ve 0,1 M fosfat tamponu pH 8,0 kullanılarak 37 °C'de 30 dak inkübasyon sonrası 412 nm'de 5 dak süresince takip edilmiş ve iki canlı için sırasıyla K_m 0,24 ve 0,23 mM, V_{max} ise 0.17 ve 0,16 Optik yoğunluk/mg protein/30 dak bulunmuştur. Bizim çalışmalarımızda da benzer şekilde optimum pH 8,5 ve sıcaklık 35 °C olarak bulunmuştur.

Azinfos-metil dirençli elma güvesi *Cydia pomonella* (L.), aldikarb, pirimikarb, dekametonyum, edrofonyum ve d-tubokunarin gibi AChE inhibitörleri potasyum fosfat tamponunda çözülerek, karbaril, paraokson, klorfiyrifos-okson ve azinfos-metil-okson ise etanolde çözülerek enzim homojenatı, fosfat tamponu ve DTNB içeren karışım ile 4 °C'de 20 dak inkübe edilmiş ve ATC, PTC ve BTC substratlarının ilavesi ile başlatılan enzimatik reaksiyon sonucu tüm inhibitörlerde kompetatif inhibisyon gözlenmiştir. Azinfos-metil'e dirençli ve hassas türlerle yapılan çalışmada, ATC substratı için hassas bireylerde K_m 0,5 mM, V_{max} 159,8; dirençli bireylerde ise K_m 0,9 mM, V_{max} 106; PTC substratı için hassas bireylerde K_m 0,9 mM, V_{max} 136,6; dirençli bireylerde ise K_m 1,3, V_{max} 79,9 olarak bulunmuştur. AChE aktivitesi 10 mM'ın üzerindeki substrat

konsantrasyonunda ATC substratı ile inhibisyona uğrarken PTC substratı ile bir inhibisyon gözlenmemiştir. BTC substratı ise elma güvesi AChE'ı ile güçlükle hidrolize olmuştur (Reuveny ve Cohen 2004). Kristoff vd (2006)'da, gastropod *Biophalaria glabrata* ve oligoket *Lumbriculus variegatus* bireylerinde ChE karakterizasyonu reaksiyon ortamına 100 mM fosfat tamponu pH 8; 0,2 mM DTNB ve 0,75 mM ATC/1,5 mM BTC eklenerek yapılmıştır. Her iki canlıda da yüksek enzimatik aktivite bizim çalışmalarımıza benzer şekilde ATC substratında gözlenmiştir. *Biophalaria glabrata*'da ATC substratı ile yüksek aktivite gözlenirken BTC substratı ile oldukça düşük aktivite gözlenmiştir. Bizim çalışmalarımızda da BTC substratı ile daha düşük aktivite gözlenmiştir. *Lumbriculus variegatus*'ta ise *Biophalaria glabrata*'ya oranla her iki substratla daha yüksek aktivite gözlenmiştir. Sonuç olarak iki invertebrat türü arasında enzim tipi, subelular lokasyonu ve ChE aktiviteleri bakımından farklılıklar bulunmuştur.

Canlılarda birden fazla ChE bulunabilir ve bu ChE'lar antikolinesteraz ajanlara farklı hassasiyetler gösterebilmektedirler (Kristoff vd 2006). *Drosophila melanogaster*'de glikolipid ankor yolu ile ampifilik dimer bağıyla membrana bağlı sadece bir ChE bulunurken nematod *Caenorhabditis elegans*'ta üç farklı gen substrat spesifiteleri farklı (Johnson ve Russell 1983, Johnson vd 1988) olan üç farklı AChE'ı kodlamaktadır (Johnson vd 1981, Marcel vd 1998). Ampifilik tetramer için kodlanan bu genlerden biri *in vitro* olarak klonlanmış ve ekspres edilmiştir (Arpagaus vd 1994, Marcel vd 1998). *Drosophila* ve nematod'daki bu iki enzim AChE olarak dikkate alınabilmektedir. Vertebratlardan farklı olarak bu AChE'lar butiriltiliyokolini etkili bir şekilde hidrolize edebilmektedirler (Johnson ve Russell 1983, Gnagey vd 1987, Marcel vd 1998). Yapılan ChE karakterizasyonu çalışmalarımızda özellikle optimum sıcaklığın tesbitinde, ATC ve PTC substratları ile birbiriyle yakın ilişki gözlenirken BTC substratı ile diğer iki substrata oranla daha farklı bir eğri gözlenmiştir. ATC ve PTC'de sıcaklık eğrisi iki pikli, BTC'de ise daha kararlı ve değişmeyen bir pik gözlenmiştir. Bu da bize, bu substratları katalizleyebilen AChE'den başka bir enzim ya da izozimi olabileceğini göstermiştir.

L. profundicola sitozolik ChE aktivitesi üzerine paraokson-metil inhibisyon etkisi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak çalışılmıştır. *In vitro* inhibisyon çalışmaları sonucunda, her bir substratın belirlenen konsantrasyonları için inhibitör konsantrasyonu

artıkça artan inhibisyon gözlenmiştir. Elde edilen veriler sonucu çizilen Diskon plot grafiği ile inhibisyon kinetikleri çıkarılmıştır. AChE, PChE ve BChE paraoxon-metil inhibisyonunda tam belirlenememekle birlikte karışık tip inhibisyon gözlenmiştir. AChE, PChE ve BChE inhibisyon tiplerinde ki bu farklılıkların ve belirsizliklerin enzimimizin saf enzim olmamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca esterazların geniş çeşitlilikteki substratları katalizleyebildiği ve canlı türlerine göre spesifikliklerinin ve inhibisyon özelliklerinin değiştiği bilinmektedir. Bunun da, sonuçlarımızdaki farklılıkların bir nedeni olabileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.2 Çürüksu Çayı üzerinde belirlenen istasyonlardan toplanan *L. profundicola* bireylerinde sitozolik ChE aktiviteleri

ChE Aktiviteleri (U/dak/mg protein)			
	Güzelköy	Korucuk	Sığma
AChE	4955 ± 583	8021 ± 579	9358 ± 270
PChE	3040 ± 232	4917 ± 176	5648 ± 457
BChE	1813 ± 81	2660 ± 54	2835 ± 77

Farklı istasyonlardan toplanan (Bkz. Tablo 4.2) ve metomil, deltametrin, metilparatyon, petrokimyasal atık çamur ile suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde (Bkz. Tablo 4.3) sitozolik ChE aktiviteleri ve inhibisyonları ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak tespit edilmeye çalışılmıştır. OP ve karbamat pestisitlerce AChE inhibisyonu bir biyomarkör olarak kullanılmaktadır (Bocquené vd 1997). ve farklı balık türlerinde AChE'in OP'lara spesifik aktivitesi ve sensitivitesinin çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur (Li ve Fan 1996, Chuiko 2000, Chuiko vd 2003, Eder vd 2004, Silva Filho vd 2004, Yi vd 2006). Balıklarda (Weiss,1959) ve akuatik invertebratlarda (Bocquené vd 1991, Day ve Scott 1990) ChE aktivitesinde azalma anti-ChE maruziyeti ile ilgilidir ve bir su kontaminasyonu indikatörü olarak gösterilmektedir. Sturm vd (1999), Cajaraville vd (2000) ve De la Torre (2002) yaptığı çalışmalara göre balıklarda AChE'in deniz ve tatlı su ekosistemlerinin insektisitlerce kontaminasyonun izlenmesinde yararlı olduğunu bildirmişlerdir (Yi vd 2006).

Tablo 4.3 Metomil, deltametrin, metil-paratiyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde sitozolik ChE aktiviteleri

ChE Tipi	ChE Aktiviteleri (U/dak/mg protein)				
		1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün
AChE	Kontrol	7559 ± 445	7184 ± 303	8533 ± 756	7593 ± 181
	Metomil	1895 ± 320	3229 ± 483		
	Deltametrin	3420 ± 206	4029 ± 580	5070 ± 309	5858 ± 433
	Metil-paratiyon	479 ± 52	396 ± 118	342 ± 132	259 ± 67
	Atık çamur	7343 ± 441	6928 ± 140	7479 ± 512	
	Atık su	7465 ± 415	7283 ± 628	7592 ± 137	
PChE	Kontrol	4678 ± 247	4516 ± 139	5265 ± 396	4662 ± 234
	Metomil	1181 ± 403	1909 ± 244		
	Deltametrin	2962 ± 419	3215 ± 393	3570 ± 293	4027 ± 428
	Metil-paratiyon	320 ± 72	238 ± 29	131 ± 48	156 ± 43
	Atık çamur	4422 ± 402	4070 ± 230	4253 ± 376	
	Atık su	4423 ± 197	4330 ± 144	4518 ± 335	
BChE	Kontrol	3139 ± 170	3320 ± 231	3633 ± 142	3430 ± 215
	Metomil	747 ± 84	1560 ± 171		
	Deltametrin	1532 ± 191	2167 ± 97	2624 ± 23	2652 ± 155
	Metil-paratiyon	181 ± 34	111 ± 31	58 ± 17	65 ± 17
	Atık çamur	3009 ± 285	2934 ± 211	2972 ± 184	
	Atık su	3063 ± 219	3150 ± 368	3241 ± 274	

Çeşitli invertebrat türlerinin çeşitli pestisitlere maruz bırakılmaları ile yapılan çalışmalarda ChE inhibisyonları gözlenmiştir. Örneğin; yaşam alanı pestisit fenitrotiyon ile muamele edilmiş kırmızı bataklık kereviti *Procambarus clarkii*'de muamele öncesi AChE aktivitesi $9,4 \text{ nmol dak}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein olarak bulunurken muamele sonrası $4,2 \text{ nmol dak}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein bulunmuş ve AChE'in pestisit maruziyeti için bir biyomarkör olarak kullanılabilceği saptanmıştır (Porte ve Escartin 1997). Diklorvos, paratiyon ve aldikarb'a maruz bırakılmış *Daphnia magna* ve *Chironomus riparius* bireylerinde kontrollere oranla ChE inhibisyonu saptanmıştır. Ölümsüzlük

EC₅₀ değerleri *Daphnia magna* için paratyon'da %98,9, diklorvos'ta %75,5, aldikarb'da %77,9 bulunurken *Chironomus riparius* için paratyon'da %84, diklorvos'ta %77-83, aldikarb'da %53 bulunmuştur (Sturm ve Hansen 1999). Kheir vd (2001)'de, permetrin, çinko, pirimifos-metil ve lindan'a maruz bırakılan *Chironomus riparius* bireylerinde 24 sa ve 48 sa'lik pirimifos-metil maruziyetinde AChE inhibisyonu gözlenirken permetrin ve çinko'ya maruz bırakılanlarda bir etki saptanmamıştır. 24 ve 48 sa'lik bireylerde 1 ve 5 µg/g pirimifos-metil konsantrasyonlarında yüksek AChE inhibisyonu gözlenmiştir. Ayrıca 24 sa lindan'a maruz bırakılan larvalarda AChE aktivitesinde önemli farklılıklar bulunmuştur. Fakat lindan'ın spesifik bir kolinesteraz inhibitörü olmaması nedeniyle inhibisyon monotonik bulunmamış ve 5 µg/g'lık yüksek konsantrasyonda anlamlı bir inhibisyon gözlenmemiştir. Benzer şekilde 48 ve 96 saat 0, 5, 10 ve 50 ng/g OP insektisit primifos-metil'e maruz bırakılan *Chironomus riparius* larvalarında, AChE aktivitelerinde yüksek derecede anlamlı farklılık bulunmuştur. 10 ng/g insektisite maruz bırakılan larvalarda AChE aktivitesi redüklenmiş 50ng/g'da ise larvalar ölmüştür (Crane vd 2002). Doğruluğu ortaya konmuştur ki OP *Chironomus riparius* bireylerinde ChE aktivitesini inhibe etmektedir (Callaghan vd 2001, 2002, Detra ve Collins 1991, Ibrahim vd 1998, Crane vd 2002) ve Chironomid'lerde AChE inhibisyonu güçlü bir biyomarkördür (Callaghan vd 2002). Kristoff vd (2006), gastropod *Biophalaria glabrata* ve oligoket *Lumbriculus variegatus* bireylerinde OP pestisit azinfos-metil ile indüklenen ChE aktivitesinde iki invertebrat türünde de 24 ve 48 sa'lik *in vivo* azinfos-metil maruziyetinde ChE inhibisyonu gözlenmiştir. 72 ve 96 sa'lik maruziyetlerde ise 48 sa'lik maruziyetteki inhibisyona oranla anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Rao vd (2003)'te klorfiyrifos'a maruz bırakılan toprak solucanı *Eisenia foetida*'da klorfiyrifos'un konsantrasyon bağımlı olduğu ve artan pestisit konsantrasyonlarında hayatta kalan yüzdesinin azaldığı görülmüştür. AChE aktivitesinde 12, 24, 36 ve 48 sa maruziyette sırasıyla %60, %79, %85 ve %91 artan inhibisyon gözlenmiştir. Srinivas vd (2004)'da sipermetrin, fenvalerat, endosulfan, monokrotofus ve kuinolfofos'a dirençlilikleri test edilen *Helicoverpa armigera*'larda dirençli larvalarda AChE monokrotofus ve metil-paraokson'da daha duyarlı bulunmuştur. Ayrıca ölçülen esteraz, fosfataz ve paraokson hidrolaz aktiviteleri hassas soylara oranla dirençli soylarda daha yüksek bulunmuştur. Kousba vd (2004)'da erkek Sprague-Dawley ratlarından elde edilen beyin fraksiyonları %50 inhibitör konsantrasyonları üzerinden klorfiyrifos-okson ve paraokson ile inkübe edilmiştir. 1 pM klorfiyrifos-okson ve paraokson

konantrasyonlarında total beyin AChE aktivitesi 3-4 sa inkübasyon sonucu sırasıyla %30 ve %40 inhibe olmuştur. Rat beyin AChE aktivitesi yüksek okson konsantrasyonu ile inkübasyonda klorfiyrifos-okson, paraokson'dan daha *in vitro* inhibisyon göstermiştir. Wheelock vd (2005)'de klorfiyrifos ve esfenvalerat'a maruz bırakılan Şinuk som balığı *Oncorhynchus tshawytscha* juvenil bireylerde, 7,3 µg/lit klorfiyrifos'a maruz bırakılan bireylerde beyin ve kas dokusunda %85 ve %90 AChE inhibisyonu saptanırken esfenvalerat'ta hiçbir etki bulunmamıştır. Literatür bilgileri ile karşılaştırıldığında benzer şekilde bizim çalışmalarımızda da OP insektisit metilparatyon'a maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde yüksek ChE inhibisyonu gözlenirken sırasıyla karbamat insektisit metomil ve piretroid insektisit deltametrin'e maruz bırakılan bireylerde daha düşük ChE inhibisyonu saptanmıştır.

da Silva vd (2005)'de *Crassostrea rhizophorae* mollusklarında tuzluluğun GST, G6PDH, CAT ve AChE aktiviteleri nominal konsantrasyonlarda dizel yağa maruziyet sonucu etkisi çalışılmış ve 25 ve 15 ppt tuzluluk derecelerinde dizel yağa maruziyette GST aktivitesinde artış gözlenirken G6PDH, CAT ve AChE aktivitelerinde bir farklılık gözlenmemiş ve bu konuda AChE uygun bir biyomarkör olarak görülmemiştir. Bizim çalışmalarımızda da petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde ChE inhibisyonu gözlenmemiştir.

Artan çevre kirliliği ile birlikte, çevresel kirleticilerin tüm canlı organizmalarda bulunan ve ilaçlar, çevresel kirleticileri içeren kimyasallar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi karsinojenler ile pestisitler gibi ekzojenik maddelerin (Nelson vd 1996, Crampton vd 1999, Bylund vd 2001, Cui ve Strobel 2002, Ranson vd 2002) sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar tarafından metabolize edilmesi ve çeşitli çevresel kirleticilere maruz kalan bireylerde spesifik P450 izozimlerinin artması (Scott 1999, Londoño vd 2004) nedeniyle bu konu ile ilgili çalışmalar da büyük önem kazanmıştır. Sitokrom P450'ler arasında sitokrom P4501A biyoaktivasyonda önemli rol oynamaktadır. Balıklarda sitokrom P4501A proteini karsinojenlerin biyoaktivasyonu ve metabolizmasındaki rollerinden (Gelboin 1980, Conney 1982, Stegeman 1995), çevresel kirlilik için biyomarkör olarak kullanılma potansiyellerinden (Goksoyr ve Förlin 1992, Arınç vd 2000) dolayı oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır. 3-MC, B(a)P, TCDD, PCB, PAH ve diğer halojenli bileşikler sitokrom P4501A1'in güçlü indükleyicileri olarak bilinmektedirler. Fakat böcek sitokrom P450'leri katalizledikleri

reaksiyonlar ve reaksiyonların model indükleyicileri bakımından vertebratlardaki benzerlerinden farklıdır. Vertebrat P4501 indükleyicisi, böceklerde etkili değildir. Fakat birçok memeli P450 II ve IV geni indükleyicisi böcek P450'lerini de indüklemektedir (Ronis ve Hodgson 1989, Sturm ve Hansen 1999).

Tablo 4.4 Metomil, deltametrin, metil-paratyon, petrokimyasal atık çamur ve suya maruz bırakılan *L. profundicola* bireylerinde mikrozomal EROD aktiviteleri

EROD Aktiviteleri (pmol Rez./dak/mg protein)				
	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün
Kontrol	1,252 ± 0,75	1,035 ± 0,67	1,114 ± 0,80	0,375 ± 0,08
Metomil	2,980 ± 1,20	1,836 ± 0,47		
Deltametrin	3,375 ± 1,92	3,484 ± 1,68	2,701 ± 1,20	2,566 ± 0,55
Metil-paratyon	3,691 ± 0,19	3,188 ± 1,69	1,395 ± 0,05	2,370 ± 0,83
Atık çamur	4,362 ± 1,87	2,585 ± 0,53	3,678 ± 0,72	
Atık su	3,697 ± 0,97	2,629 ± 0,64	3,608 ± 0,59	

Çeitli canlılarla yapılan çalışmalarda, PAH'lar gibi ksenobiyotiklere maruz kalan canlılarda EROD aktivitelerinde artış kaydedilmiştir. Achazi vd (1998)'da *Eisenia fetida* pentoksirezorufin aktivitesi 0,26-1,05 pmol/dak/mg protein, benzoksirezorufin aktivitesi ise 0,14-0,30 pmol/dak/mg protein; *Enchytraeus crypticus* EROD aktivitesi ise 2,10-6,18 pmol/dak/mg protein, pentoksirezorufin aktivitesi ise 1,75-4,78 pmol/dak/mg protein olarak ölçülmüştür. BaP maruziyetinde EROD aktivitesinde %45 indüksiyon gözlenirken pentoksirezorufin aktivitesinde gözlenmemiştir. Saflaştırılmış mikrozomal proteinlerle yapılan SDS-PAGE ve (*Perca fluviatilis*) CYP1A antikoru kullanılarak yapılan immunokimyasal analizlerde sinyal gözlenmiştir. Lee (1981)'de yiyecekleriyle benzo(a)piren ya da poliklorlubifeniller'e maruz bırakılan poliket *Nereis virens*'lerde sitokrom P450 konsantrasyonlarında kontrollere oranla 2 kat artış gözlenmiştir. Benzer şekilde, petrolle ikinci derece kirletilmiş *N. virens*'lerde etoksirezorufin O-deetilaz aktivitesi çalışılmış ve referans kurtlara oranla yüksek aktivite bulunmuştur (Reily vd 1992). Bivalf *Donax trunculus*, *Patella caerulea*, *Avicularia gibbosula* ve *Brachidontes variabilis* mikrozomal EROD aktiviteleri 24-53 pmol/dak/mg protein arasında (Yawetz vd 1992), *Planorbis carinatus* EROD aktivitesi 1,53 ± 0,29 nmol/dak/mg protein (Meimberg 1995), Cyprinidae'ye ait tatlı su

balıklarında EROD aktiviteleri 6-23 pmol/dak/mg protein, gökkuşağı alabalığında 60-580 pmol/dak/mg protein, tatlı su levreğinde 100-2000 pmol/dak/mg protein (Achazi vd 1994) olarak bulunmuştur. Ayrıca parafin, antrasen, perilen, 3-MC ve petrol hidrokarbonlarına maruz bırakılan *Mytilus galloprovincialis*'te CYP450, sitokrom *b*₅ ve NADPH-sitokrom C redüktaz seviyelerinde artış gözlenmiştir (Moore vd 1989). Bizim çalışmalarımızda da benzer şekilde petrokimyasal atık çamur ve su ile muamele edilen *L. profundicola* bireylerinde mikrozomal EROD aktivitelerinde artış ve kontrollere oranla istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken günler arasında bir farklılık gözlenmemiştir (Bkz. Şekil 3.19, 3.20 ve Tablo 4.4).

OP'lar, balıkta kirlilik biyomarkör enzimi olarak kullanılan CYP1A'yı içeren CYP aktivitesini baskılamaktadırlar (Flammarion vd 1998, Wheelock vd 2005). Organofosfatlara karşı, piretroidlerin metabolizması bir detoksifikasyon prosesidir (Casida ve Quistad 1995, Wheelock vd 2005). Artan CYP aktivitesi böceklerin piretroidlere dirençliliğinde önemli bir mekanizmadır (Scott 1999). Malatyon gibi fosforoditiyoat'lar ya da klorfiyrifos ve metil-paratyon gibi fosforotiyoat'lar sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar (sülfoksidasyon) tarafından biyoaktif edilmektedirler ve oluşan okson analogu daha potansiyel AChE inhibitörüdür (Chambers 1992). Yükselen CYP aktivitesi böceklerin esfenvalerat'ı içeren piretroidlere dirençlilik mekanizmasında önemlidir (Scott 1999, Wheelock vd 2005). Pestisit fenitrotiyon'a maruz bırakılan kırmızı bataklık kereviti *Procambarus clarkii*'de muamele öncesi EROD aktivitesi $0,68 \pm 0,58$ pmol dak⁻¹ mg⁻¹ protein olarak saptanırken muamele sonrası $2,73 \pm 2,63$ pmol dak⁻¹ mg⁻¹ protein olarak saptanmıştır (Porte ve Escartin 1997). Piretroid insektisit fenobarbitol ve permetrin'e maruz bırakılan *Chironomus riparius* bireylerinde EROD aktivitesinin indüklediği bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, *C. riparius* bireylerinde EROD aktivitesinin tatlı su kirliliğinin belirlenmesinde uygun biyomarkörlerin eklenmesi ile tespit edilebileceğini göstermiştir (Fisher vd 2003). Bizim sonuçlarımızda da benzer şekilde aynı grup insektisit deltametrin'e maruz bırakılan bireylerde mikrozomal EROD aktivitelerinde artış ve istatistiksel açıdan farklılıklar gözlenirken günler arasında bir fark bulunamamıştır (Bkz. Şekil 3.17 ve Tablo 4.4). Wheelock vd (2005)'da som balığı *Oncorhynchus tshawytscha* juvenil bireyler klorfiyrifos (OP) ve esfenvalerat (karbamat)'a maruz bırakılmış CYP1A protein seviyelerinde yüksek dozda klorfiyrifos'ta %30 artış görülürken esfenvalerat'ta bir etki saptanamamıştır. Dichlorvos, parathion ve aldikarb'a

maruz bırakılan *Daphnia magna* ve *Chironomus riparius* bireylerinde ölçülen EROD, MROD ve ECOD aktiviteleri *Daphnia magna*'da saptanamazken *C. riparius* bireylerinde kontrollere oranla EROD, MROD ve ECOD aktiviteleri saptanmıştır. Paratyon'un sitokrom P450 bağımlı enzimler üzerine bir etkisi saptanamamıştır (Sturm ve Hansen 1999) Bizim çalışmalarımızda da 4 günlük metil-paratyon maruziyetinde ölçülen EROD aktivitelerinde istatistiksel olarak kontrollere oranla düzensiz farklılıklar bulunmuştur. Bu nedenle metil-paratyon maruziyetinde EROD indüksiyonundan bahsetmemiz hatalı olacaktır (Bkz. Şekil 3.18 ve Tablo 4.4).

Yapılan çalışmalarda *L. profundicola* sitozolik ChE aktivitesi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak karakterize edilmiş ve ChE aktivitesi üzerine organofosfatlı, karbamatlı, piretroidli insektisitlerin etkisi incelenmiş insektisitlerin enzim aktivitesini önemli derecede inhibe ettiği bulunmuştur. Çürüksu Çayı üzerinde belirlenen istasyonlardan toplanan *L. profundicola* bireylerinde AChE aktiviteleri ölçülmüş ve farklı ortamlardan toplanan bireylerde AChE aktivitelerinde farklılıklar bulunmuştur. Yapılan *in vivo* çalışmalar sonucunda özellikle metil-paratyon'a maruz bırakılan canlılarda kontrol gruba oranla yüksek derecede AChE, PChE ve BChE inhibisyonu gözlenmiştir. OP insektisitler ChE'lara geri dönüşümsüz olarak bağlanmakta ve inhibisyona neden olmaktadır. Bu nedenle metil-paratyon'un yüksek derecede inhibisyona neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. Deltametrin uygulanan bireylerde metil-paratyon ve metomil uygulanan bireylere oranla daha az AChE, PChE ve BChE inhibisyonu bulunmuş ve inhibisyonun 3. ve 4. günlere doğru azaldığı görülmüştür. CaE'lar piretroidleri daha az toksik metabolitlere dönüştürebilmektedirler. Ayrıca sitokrom P450 enzimleri de bu bileşiklerin detoksifikasyonunda rol oynamaktadır. Bu nedenle deltametrin'e maruz bırakılan bireylerde metomil ve metil-paratyon'a oranla daha düşük inhibisyon görüldüğü düşünülmektedir. Metomil'e maruz bırakılan bireylerde de AChE, PChE ve BChE inhibisyonu gözlenmiş ve 1. güne oranla 2. gün AChE, PChE ve BChE aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bu durum bize *L. profundicola* bireylerinin bu üç farklı grup insektisite karşı direnç mekanizmalarının ve detoksifikasyon proseslerinin farklı enzimler ya da metabolik yollar ile olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca *L. profundicola* bireyleri temiz ve kirli sularda yaşayabilen, sedimentte yaşaması ile birçok çevresel kirleticiye maruz kalabilen ve direnç kazanabilen bir canlıdır. Bu özellikleri, ksenobiyotiklere maruz kalan *L. profundicola* bireylerinde çeşitli direnç mekanizmalarının gelişebileceğini düşündürmektedir. Atık

çamur ve atık su uygulanan canlılarda ise ChE aktivitelerinde kontrollere oranla bir fark bulunamamıştır. PAH'lar gibi çeşitli petrol türevlerini içeren bileşiklerin vertebratlarda CYP1A1 aktivitesini indüklediği bilinmektedir ama ChE üzerine metabolik etkisi bulunmamaktadır.

Ayrıca, PAH kirliliğinin göstergesi olan Sitokrom P450 1A1 (CYP1A1) indüksiyonu için EROD aktivitesi 7-Etoksirezorufin substratı kullanılarak ölçülmüş ve insektisitlerle, petrokimyasal atıklara maruz bırakılan bireylerde istatistiksel olarak farklılıklar bulunmuştur. Kontrol olarak 3-MC ile indüklenmiş rat mikrozomunun kullanıldığı Western blot analizlerinde anti-Rat CYP1A1 ve CYP4A antikoru kullanılmış ve *L. profundicola* mikrozomlarında bu enzimlerin varlığı tespit edilememiştir. 3-MC ile indüklenen Rat mikrozomunda CYP1A1 bandı gözlenirken *L. profundicola* mikrozomlarında bant görülmemiştir. Bunun anti-Rat CYP1A1 ve CYP4A'nın bizim numunelerimizdeki proteini tanınamamasından ya da EROD aktivitelerinin çok düşük olmasından dolayı saptanabilecek yoğunlukta olamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Menderes Nehri'nin bir kolu olan Çürüksu Çay'ı üzerinde belirlenen Sığma istasyonundan elde edilen *L. profundicola* bireylerinde ChE aktivitesi ATC, PTC ve BTC substratları kullanılarak karakterize edilmiştir. Yine Çürüksu Çay'ı üzerinde kirlilik derecesine göre belirlenen 3 farklı istasyondan toplanan *L. profundicola* bireylerinde AChE, PChE ve BChE aktiviteleri ölçülmüş ve aralarında farklılıklar bulunmuştur. Kirlilik derecesinin fazla olduğunu düşündüğümüz Güzelköy istasyonundan toplanan canlılarda ChE aktivitesinde yüksek inhibisyon gözlenirken kirlilik derecesinin daha düşük olduğunu düşündüğümüz Sığma istasyonundan toplanan canlılarda daha düşük inhibisyon bulunmuştur.

Sonuç olarak, kirliliğe duyarsız olmayan ama dirençlilik kazanabilen, kirliliğe ve temiz sularda yaşayabilen kozmopolit bir tür olan *L. profundicola* geniş çeşitlilikteki çevresel koşullara adapte olabilir ve kirlilik ve ekotoksikolojik çalışmalarda biyomarkör organizma olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Halim, K. Y., Salama, A. K., El-khateeb, E. N., and Bakry, N. M. (2006) Organophosphorus Pollutants (OPP) in Aquatic Environment at Damietta Governorate, Egypt: Implications for Monitoring and Biomarker Responses. *Chemosphere.*, 63: 1491-1498.
- Abernathy, C. O., and Casida, J.E. (1973) Pyrethroid Insecticides: Esterase Cleavage in Relation to Selective Toxicity. *Science*, 179: 1235-1236.
- Achazi, R. K., Chroszcz, G., Heiming, E., Neunaber, R., and Steudel, I. (1994) A High-Molecular Regulator of 7-ethoxyresorufin-*O*-deethylase Activity in Fish. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 108 C: 243-256.
- Achazi, R. K., Flenner, C., Livingstone, D. R., Peters, L. D., Schaub, K., and Scheiwe, E. (1998) Cytochrome P450 and Dependent Activities in Unexposed and PAH-exposed Terrestrial Annelids. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 121 C: 339-350.
- Ahmad, M., and McCaffery, A. R. (1991) Elucidation of Detoxification Mechanisms Involved in Resistance to Insecticides in the 3rd Instar Larvae of a Field Selected Strain of *H. armigera* with the Use of Synergists. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 41: 41-52.
- Aldridge, W. N. (1950) Some Properties of Specific Cholinesterase with Particular Reference to the Mechanism of Inhibition by Diethyl-*p*-nitrophenyl thiophosphate and Analogs (E605). *Biochem. J.*, 46: 451-460.
- Aldridge, W. N. and Reiner, E. (1972) Acylated Amino Acids in Inhibited B-Esterases. In: Neuberger, A., Tatum, E. L. (Eds.), Enzyme Inhibitors as Substrates. North-Holland, Amsterdam, pp. 170-175.
- Arinc, E., and Sen, A. (1994) In vivo Effects of Anesthetic Benzocaine, on Liver Microsomal Cytochrome P450 and Mixed-Function Oxidase Activities of Gilthead Seabream (*Srarus aurata*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 107 C: 399-404.
- Arinc, E., Sen, A., and Bozcaarmutlu, A. (2000) Cytochrome P4501A and Associated Mixed-Function Oxidase Induction in Fish as a Biomarker for Toxic Carcinogenic Pollutants in the Aquatic Environment. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 72, No. 6, pp. 985-994.
- Armes, N. J., Jadhav, D. R., Bond, G. S., and King, A. B. S. (1992) Insecticide Resistance in *H. armigera* in South India. *Pestic. Sci.*, 34: 355-364.
- Armes, N. J., Jadhav, D. R., and De Souza, K. R. (1996) A Survey of Insecticide Resistance in *H. armigera* in the Indian Subcontinent. *Bull. Entomol. Res.*, 86: 499-514.

- Armes, N. J., Wightman, J. A., Jadhav, D. R., and Ranga Rao, G. V. (1997) Status of Insecticide Resistance in *Spodoptera litura* in Andhra Pradesh, India. *Pestic. Sci.*, 50: 240-248.
- Arpagaus, M., Fedon, Y., Cousin, X., Chatonnet, A., Bergé, J. B., Fournier, D., and Tautant, J. P. (1994) cDNA sequence, gene structure, and in vitro expression of ace-1, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 269: 9957-9965.
- Bakry, N. M., Osman, K. A., El-Aswad, A. F., Abde-Halim, Kh. Y., and Abou-Donina, M. B. (2001) Biomonitoring of Pesticide Contamination from the Pesticide Industry. *J. Egypt. Soc. Toxicol.*, 24: 107-111.
- Barry, M. J., Ohallaron, K., Logan, D. C., Ahokas, J. T., and Holdway, D. A. (1995) Sublethal Effects of Esfenvalerat Pulse-exposure on Spawning and non-Spawning Australian Crimson-spotted Rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Arch. Environ. Con. Tox.*, 28: 459-463.
- Basack, S. B., Oneto, M. L., Fuchs, J. S., Wood, E. J., and Ketsen, E. M. (1998) Esterases of *Corbicula fluminea* as Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61: 569-576.
- Belden, J. B., and Lydy, M. J. (2001) Effects of Atrazine on Acetylcholinesterase Activity in Midges (*Chironomus tentans*) Exposed to Organophosphorus Insecticides. *Chemosphere.*, 44: 1685-1689.
- Bellanger, C., Dauphin, F., Belzunces, L. P., and Chichery, R. (1998) Parallel Regional Quantification of Choline Acetyltransferase and Cholinesterase Activity in the Central Nervous System of an Invertebrate (*Sepia officinalis*). *Brain Research Protocols.*, 3: 68-75.
- Beyers, D. W., and Sikoski, P. J. (1994) Acetylcholinesterase Inhibition in Federally Endangered Colorado Squawfish Exposed to Carbaryl and Malathion. *Environ. Toxicol. Chem.*, 13: 935-939.
- Bocquené, G., and Galgani, F. (1991) Acetylcholinesterase Activity in the Common Prawn (*Palaemon serratus*) contaminated by Carbaryl and Phosalone: Choice of a method for Detection of Effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 22: 337-334.
- Bocquené, G., Roig, A., and Fournier, D. (1997) Cholinesterases from the Common Oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the Presence of a Soluble Acetylcholinesterase Insensitive to Organophosphate and Carbamate Inhibitors. *FEBS Lett.*, 407: 261-266.
- Brestkin, A. P., Kuznetsova, L. P., Moralev, S. N., Rozengart, E. V., and Epshtein, L. M. (1997) Cholinesterases of the Terrestrial Animals and Hydrobionts (In Russian). TINRO-center, Vladivostok.
- Brown, M. T., and Bryson, P. K. (1992) Selective Inhibitors of Methyl Parathion-resistant Acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 44: 55-164.

- Burke, M. D., and Mayer, R. T. (1974) Ethoxyrezorufin: Direct Fluorometric Assay of Microsomal *O*-dealkylation which is Preferentially Induced by 3-Methylcholanthrene. *Drug Metab. Disp.*, 2: 583-588.
- Bylund, J., Bylund, M., and Oliw, E.H. (2001) cDNA Cloning and Expression of CYP4F12, a Novel Human Cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 280: 892-897.
- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., and Viarengo, A. (2000) The Use of Biomarkers to Assess to Impact of Pollution in Coastal Environments of the Iberian Peninsula: a Practical Approach. *Sci. Total Environ.*, 247: 295-311.
- Callaghan, A., Hithe, G., Fisher, T., and Crane, M. (2001) Effects of Short-term of Exposure to Chlorpyrifos on Biochemical, Behavioural, and Life-history Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 50: 19-24.
- Callaghan, A., Fisher, T. C., Grosso, A., Holloway, G. J., and Crane, M. (2002) Effect of Temperature and Primiphos Methyl on Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 52: 128-133.
- Carr, R. L., and Chambers, J. E. (1996) Kinetic Analysis of the in vitro Inhibition, Aging, and Reactivation of Brain Acetylcholinesterase from Rat and Channel Catfish by Paraoxon and Chlorpyrifos-oxon. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139: 365-373.
- Casida, J. E. and Quistad, G. B. (1995) Metabolism and Synergism of Pyrethrins. In: Casida, J. E., Qistad, G. B. (Eds.), *Pyrethrum Flowers: Production, Chemistry, Toxicology and Uses*. *Oxford University Pres*, New York, NY, pp. 258-276.
- Casida, J. E., and Quistad, G. B. (2004) Organophosphate Toxicology: Safety Aspects of Nonacetylcholinesterase Secondary Targets. *Chem. Res. Toxicol.*, 8: 983-998.
- Ceron, J. J., Ferrando, M. D., Sancho, E., Gutierrez-Panzio, C., and Andreu-Moliner, E. (2003) Effects of Diazinon Exposure on Cholinesterase Activity in Different Tissues of European Eel (*Anguilla anguilla*). *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 35: 222-225.
- Chambers, W. H. (1992) Organophosphorus Compounds: an Oveview. In: Chambers, J. E., and Levi, P. E. (Eds), *Organophosphates, Chemistry, Fate and Effects*. *Academic Press*, San Diego, pp. 3-17.
- Chandrasekara, L. W. H. U., and Pathiratne, A. (2006) Body Size-related Differences in the Inhibition of Brain Acetylcholinesterase Activity in Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by Chlorpyrifos and Carbosulfan. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, in press.
- Cheng, W.-X., Wang, J.-J., Ding, W., and Zhao, Z.-M. (2004) Inhibition Kinetics on Carboxylsterase and Acetylcholinesterase of *Liposcelis bostrychophila* and *Liposcelis entomophila* (Psocop., Liposcelididae) of Two Insecticides. *JEN*, 128 (4): 292-297-6.

- Chuiko, G. M. (2000) Comparative Study of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in Brain and Serum of Several Freshwater Fish: Specific Activities and in vitro Inhibition by DDVP, an Organophosphorus Pesticide. *Comp. Biochem. Physiol.*, 127 C: 233-242.
- Chuiko, G. M., Podgornaya, V. A., and Zhelmin, Y. Y. (2003) Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Activities in Brain and Plasma of Freshwater Teleosts: Cross-species and Cross-family Differences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 135 B: 55-61.
- Conney, A. H. (1982) Induction of Microsomal Enzymes by Foreign Compounds and Carcinogenesis by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Res.*, 42: 4875-4917.
- Cooper, N. L., and Bidwell, J. R. (2006) Cholinesterase Inhibition and Impacts on Behavior of the Asian Clam, *Corbicula fluminea*, After Exposure to an Organophosphate Insecticide. *Aquat. Toxicol.*, 76: 258-267.
- Crampton, A.L., Baxter, G.D., and Barker, S.C. (1999) Identification and Characterization of a Cytochrome P450 Gene Processed Pseudogene from an Arachnid: the Cattle Tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, 29: 377-384.
- Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P., and Walker, C. (1995) The Effect of Malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) Below Watercress Beds. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14: 1181-1187.
- Crane, M., Sildanchandra, W., Kheir, R., and Callaghan, A. (2002) Relationship Between Biomarker Activity and Developmental Endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an Organophosphate Insecticide. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 53: 361-369.
- Cui, X., and Strobel, H.W. (2002) Cloning and Characterization of the Rat Cytochrome P450 4F5 (CYP4F5) Gene. *Gene.*, 297: 179-187.
- Cygler, M., Schrag, J. D., Susman, J. L., Harel, M., Silman, J., Gentry, M. K. and Dector, B. P. (1993) Relationship Between Sequence Conservation and Three-Dimensional Structure in a Large Family of Esterases, Lipases and Related Proteins. *Protein Sci.*, 2: 336-382.
- Da Silva, A. Z., Zanette, J., Ferreira, J. F., Guzenski, J., Marques, M. R. F., and Bainy, A. C. D. (2005) Effects of Salinity on Biomarker Responses in *Crassostrea rhizophorae* (Mollusca, Bivalvia) Exposed to Diesel Oil. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 62: 376-382.
- Das, B. K., and Mukherjee, S. C. (2000) Chronic Toxic Effects of Quinalphos on Some Biochemical Parameters in *Labeo rohita*. *Toxicol. Lett.*, 114: 11-18.
- Day, K. E., and Scott, I. (1990) Use of AChE Detect Sublethal Toxicity in Stream Invertebrates Exposed to Low Concentrations of Organophosphorus Pesticides. *Aquat. Toxicol.*, 18: 101-104.

- De la Torre, F. R., Ferrari, L., and Salibian, A. (2002) Freshwater Pollution Biomarker: Response of Brain Acetylcholinesterase Activity in Two Fish Species. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 131: 271-280.
- Dembélé, K., Haubruge, E., and Gaspar, C. (2000) Concentration Effects of Selected Insecticides on Brain Acetylcholinesterase in the Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 45: 49-54.
- Detra, R. L., and Collins, W. J. (1986) Characterization of Cholinesterase Activity in Larval *Chironomus riparius* Meigen (=Thummi Kiefer). *Insect Biochem. J.*, 16: 733-739.
- Detra, R., and Collins, W. J. (1991) The Relationship of Parathion Concentration, Exposure Time, Cholinesterase Inhibition and Symptoms of Toxicity in Midge Larvae (Chironomidae: Diptera). *Environ. Toxicol. Chem.*, 10: 1089-1095.
- Dittrich, V., Hassan, S. C., and Ernst, G. H. (1985) Sudanese Cotton and the White fly: a Case Study of the Emergence of a New Primary Pest. *Crop. Prot.*, 4: 161-168.
- Dittrich, V., Ernst, G. H., Ruesch, O., and Uk, S. (1990) Resistant Mechanism in Sweet Potato Whitefly (Homoptera; Aleyrodidae) Populations from Sudan, Turkey, Guatemala and Nicaragua. *J. Econ. Entomol.*, 83: 1665-1668.
- Doran, W. J., Cope, W. G., Rada, R. G., and Sandheinrich, M. B. (2001) Acetylcholinesterase Inhibition the Three Ridge Mussel (*Amblema plicata*) by Chlorpyrifos: Implications for Biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49: 91-98.
- Eder, K. J., Leutenegger, C. M., Wilson, B. W., and Werner, I. (2004) Molecular and Cellular Biomarker Responses to Pesticide Exposure to Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Mar. Environ. Res.*, 59: 809-813.
- Egeler, P., Römbke, M. M., Knacker, T., and Nagel, R. (1999) Bioaccumulation Test with Tubificid Sludgeworms in Artificial Media-Development of a Standardisable Method. *Hydrobiol.*, 406: 271-280.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr., V., and Feather-Stone, R. M. (1961) A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- Ey, P. L., and Ashman, L. K. (1986) The Use of Alkaline Phosphatase-Conjugated Anti-Immunoglobulin and Immunoblots for Determining the Specificity of Monoclonal Antibodies to Protein Mixtures. *Method in Enzymology*, 121: 497-509.
- Feyereisen, R. (1999) Insect P450 Enzymes. *Ann. Rev. Entomol.*, 44: 507-533.
- French-Constant, R. H., and Bonning, B. C. (1989) Rapid Microplate Test Distinguishes Insecticide Resistant Acetylcholinesterase Genotypes in the Mosquitoes *Anopheles albimanus*, *A. nigerimus* and *Culex pipiens*. *Med. Vet. Entomol.*, 3: 9-13.

- Fisher, T. C, Crane, M., and Calaghan, A. (2000) An Optimised Microtiter Plate Assay to Detect Acetylcholinesterase Activity in Individual *Chironomus riparius* Meigen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1749-1752.
- Fisher, T., Crane, M., and Callaghan, A. (2003) Induction of Cytochrome P-450 Activity in Individual *Chironomus riparius* Meigen Larvae Exposed to Xenobiotics. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 54: 1-6.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S. B., Morfin, P. and Garric, J. (1998) Effect of Methidathion on the Cytochrome P-450 1A in the Cyprinid Fish Gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.*, 42: 93-102.
- Focardi, S., Corsi, I., Mazzuoli, S., Vignoli, L., Loiselle, S. A., and Focardi, S. (2006) Integrating Remote Sensing Approach with Pollution Monitoring Tools for Aquatic Ecosystem Risk Assessment and Managment: a Case Studdy of Lake Victoria (Uganda). *Environ. Monit. and Assess.*, 32: 579-584.
- Forget, J., Beliaeff, B., and Bocquené, G. (2003) Acetylcholinesterase Activity in Copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River Estuary, France, as a Biomarker of Neurotoxic Contaminants. *Aquat. Toxicol.*, 62: 195-204.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., and Guilhermino, L. (2006) Cholinesterase from common Prawn (*Palaemon serratus*) Eyes: Catalytic Properties and Sensitivity to Organophosphate and Carbamate Compounds. *Aquat. Toxicol.*, 77: 412-421.
- Fukuto, T. R. (1990) Mechanism of Action of Organophosphorus and Carbamate Insecticides. *Environ. Health Perspect.*, 87: 245-254.
- Fulton, M. H., and Key, P. B. (2001) Acetylcholinesterase Inhibition in Estuarine Fish and Invertebrates as an Indicator of Organophosphorus Insecticide Exposure and Effects. *Environ. Toxicol Chem.*, 20: 37-45.
- Galgani, F.,Bocquene, G., Truquet, P., Burgeot, T., Chiffolleau, J. F., and Claisse, D. (1992) Monitoring of Pollutant Biochemical Effects on Marine Organism of the French coasts. *Oceanol. Acta.*, 15: 355–364.
- Garcia, L. M., Castro, B., Ribeiro, R., and Guilhermino, L. (2000) Characteriztion of Cholinesterase from Guppy (*Poecilia reticulata*) muscle and its in vitro inhibition by Environmental Contaminants. *Biomarkers*, 5: 274-284.
- Gelboin, H. V. (1980) Benzo(a)pyrene Metabolism, Activation and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and Related Enzymes. *Physiol. Rev.*, 60: 1107-1166.
- Gnagey, A. L., Forte, M., and Rosenberry, T. L. (1987) Isolation and characterization of acetylcholinesterase from Drosophila. *J. Biol. Chem.*, 262: 13290-13298.
- Goksoyr, A., and Förlin, L. (1992) The Cytochrome P450 in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring. *Scien. Total Env.*, 287: 49-69.

- Guhathakurta, S., and Bhattacharya, S. (1988) Target and Non-target Actions of Phenthoate and Carbofuran: Brain Acetylcholinesterase, Kidney Iodide Peroxidase, and Blood Thyroxine Profiles in *Channa punctatus*. ***Biomed. Environ. Sci.***,1: 59-63.
- Gunning, R. V., Easton, C. S., Balfe, M. E., and Ferris, I. G. (1991) Pyrethroid Resistance Mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. ***Pestic. Sci.***, 33: 473-490.
- Habig, C., and DiGuilio, T. (1991) Biochemical Characteristics of Cholinesterase in Aquatic Organisms. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. ***Elsevier Science***, Amsterdam, pp. 19-33.
- Hassall, K. (1990) The Biochemistry and Uses of Pesticides. Macmillan, London.
- Hodgson, E., Rose, R. L., Goh, D. K. S., Rock, G. C., and Roe, R. M. (1993) Insect Cytochrome P-450: Metabolism and Resistance to Insecticides. ***Biochemic. Soc. Trans.***, 21: 1060-1065.
- Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T. (1987) Multiplicity and Regulation of Hepatic Microsomal Carboxylesterases in Rats. ***Mol. Pharmacol.***, 31: 579-584.
- Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T. (1990) Characterization of Molecular Species of Liver Microsomal Carboxylesterases of Several Animal Species and Humans. ***Arch. Biophys.***, 277: 219-227.
- Hosokawa, M., Endo, Y., Fujisava, M., Hara, S., Iwata, N., Sato, Y., and Satoh, T. (1995) Interindividual Variation in Carboxylesterase Levels in Human Liver Microsomes. ***Drug. Metab. Dispos.***, 23: 1022-1027.
- Hosokawa, M., Suzuki, K., Takahashi, D., Mori, M., Satoh, T., and Chiba, K. (2001) Purification, Molecular Cloning, and Functional Expression of Dog Liver Microsomal acyl-CoA Hydrolase: a Member of the Carboxylesterase Multigene Family. ***Arch. Biochem. Biophys.***, 389: 245-253.
- Huggett, R. J., Kimerle, R. A., Mehrie, P. M., and Bergman, H. L. (1992) Biomarkers: Biochemical Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stres. ***Lewis. Publishers***, London.
- Hussein, H. K., and El-Sarha, A. I. (1993) Effect of Environmental Pollution by Some Pesticides on the Mortality Rate and Behavior of the Nile Bolti *Tilapia nilotica*. ***Alex. J. Vet. Sc.***, 9: 17-24.
- Hyne, R. V., and Maher, W. A. (2003) Invertebrate Biomarkers: Links to Toxicosis That Predict Population Decline. ***Ecotoxicol. Environ. Saf.***, 54: 366-374.
- Ibrahim, H., Kheir, R., Helmi, S., Lewis, J., and Crane, M. (1998) The Effects of Organophosphorus, Carbamate, Pyrethroid and Organochlorine Pesticides and a Heavy Metal on Survival and Cholinesterase Activity of *Chironomus riparius* Meigen. ***Bull. Environ. Contam. Toxicol.***, 60: 448-455.

- Johnson, C. D., Duckett, J. G., Culotti, J. G., Herman, R. K., Meneely, P. M., and Russell, R. L. (1981) An Acetylcholinesterase-deficient Mutant of Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Genetics.**, 97: 261-279.
- Johnson, C. D., and Russell, R. L. (1983) Multiple Molecular Forms of Acetylcholinesterase in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **J. Neurochem.**, 41: 30-46.
- Johnson, C. D., Rand, J. R., Herman, R. K., Stern, B. D., and Russell, R. L. (1988) The Acetylcholinesterase Genes of *C. elegans*: Identification of a Third Gene (*ace-3*) and Mosaic Mapping of a Synthetic Lethal Phenotype. **Neuron**, 1: 165-173.
- Kallander, D. B., Fisher, S. W., and Lydy, M. J. (1997). Recovery Following Pulsed Exposure to Organophosphorus and Carbamate Insecticides in the Midge, *Ghironomus riparius*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 33: 29-33.
- Kardos, S. A., and Sultatos, L. G. (2000) Interactions of the Organophosphates Paraoxon and Methyl Paraoxon with Mouse Brain Acetylcholinesterase. **Toxicol. Sci.**, 58: 118-126.
- Karnak, R. E., and Collins, W. J. (1974) The Susceptibility to Selected Insecticides and Acetylcholinesterase Activity in a Laboratory Colony of Midge Larvae, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 12: 62-69.
- Kennaugh, L., Pearce, D., Daly, J. C., and Hobbs, A. A. (1993) A Piperonyl Butoxide Synergizable Resistance to Permethrin in *Helicoverpa armigera* Which is not Due to Increased Detoxification by Cytochrome P450. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 45: 234-241.
- Kennedy, C. R. (1966) The Life History of *Limnodrilus hoffmeisteri* Clap. (Oligochaeta, Tubificidae) and its Adaptive Significance. *Oikos* 17: 158-168.
- Kheir, R., Ibrahim, H., Lewis, J., Callaghan, A., and Crane, M. (2001) Comparison of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activity in *Chironomus riparius* Meigen Exposed to Chemical-Spiked Sediments. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 66: 603-610.
- Kırıkbakan, A. (2004) Sitokrom P4501A ve Glutatyon S-Transferaz'ların Mavri Kefal Balığından (*Liza saliens*) Karakterizasyonu ve Değişik Dokularda İmmünolojik Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, **Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Denizli, 141s.
- Kirby, M. F., Morris, S., Hurst, M., Kirby, S. J., Neall, P., Tylor, T., and Fagg, A. (2000) The Use of Cholinesterase Activity in Flounder (*Platichthys flesus*) Muscle Tissue as a Biomarker of Neurotoxic Contamination in UK Estuaries. **Mar. Pollut. Bull.**, 40: 780-791.
- Kolbezen, M. J., Metcalf, R. L., and Fukuto, T. R. (1954). Insecticidal Activity of Carbamate Cholinesterase Inhibitors. **Agric. Food Chem.**, 2: 864-870.

- Kosiorek, D. (1974) Development Cycle of *Tubifex tubifex* Müll. in Experimental Culture. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 21: 411-422.
- Kousba, A. A., Poet, T. S., and Timchalk, C. (2003) Characterization of the in vitro Kinetic Interaction of Chlorpyrifos-oxon With Rat Salivary Cholinesterase: a Potential Biomonitoring Matrix. *Toxicol.*, 188: 219-232.
- Kousba, A. A., Sultatos, L. G., Poet, T. S., and Timchalk, C. (2004) Comparison of Chlorpyrifos-oxon and Paraoxon Acetylcholinesterase Inhibition Dynamics: Potential Role of a Peripheral Binding Site. *Toxicol. Sci.*, 80: 239-248.
- Kranthi, K. R., Armes, N. J., Rao, N. G. V., Raj, S., and Sundaramurthy, V. T. (1997) Seasonal Dynamics of Metabolic Mechanisms Mediating Pyrethroid Resistance in *Helicoverpa armigera* in Central India. *Pestic. Sci.*, 50: 91-98.
- Kranthi, K. R., Jadhav, D., Wanjari, D., Kranthi, S., and Russell, D. (2001a) Pyrethroid Resistance and Mechanisms of Resistance in Field Strains of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, 94: 1-6.
- Kranthi, K. R., Jadhav, D. R., Wanjari, L. R., Alis, S. S., and Russell, D. (2001b) Carbamate and Organophosphate Resistance in Cotton Pests in India 1995 to 1999. *Bull. Entomol. Res.*, 91: 37-46.
- Kristoff, G., Guerrero, N. V., D'Angelo, A. M. P., and Cochon, A. C. (2006) Inhibition of Cholinesterase Activity by Azinphos-methyl in Two Freshwater Invertebrates: *Biphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicol.*, 222(3): 185-194.
- Kuhr, R. J., and Dorough, H. W. (1976). Carbamate Insecticide: Chemistry, Biochemistry, and Toxicology. *CRC Press.*, Ohio, p. 41.
- Kyhse-Anderson, J. (1984) Electrophoretic Transfer of Multiple Gels. A Simple Apparatus Without Buffer Tank for Rapid Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 10: 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.*, 227: 680-684.
- Lee, R. F. (1981) Mixed Function Oxygenases (MFO) in Marine Invertebrates. *Mar. Biol. Lett.*, 2: 87-105.
- Lee, R. F. (1998) Annelid Cytochrome P450. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 121 C: 173-179.
- Li, S. N., and Fan, D. F. (1996) Correlation Between Biochemical Parameters and Susceptibility of Freshwater Fish to Malathion. *J. Toxicol. Environ. Health* 48., 413-418.
- Li, B., Stribley, J. A., Ticu, A., Xie, W., Schopfer, L. M., Hammoad, P., Brimijoin, S., Hinrichs, S. H., and Lockridge, O. (2000) Abundant Tissue Butyrylcholinesterase and its Possible Function in the Acetylcholinesterase Knockout Mouse. *J. Neurochem.*, 75: 1320-1331.

- Lien, N. T., Adriaens, D., and Janssen, C. R. (1997) Morphological Abnormalities in African Catfish (*Clarias gariepinus*) Larvae Exposed to Malathion. *Chemosphere*, 35 (7): 1475-1486.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., and Schettino, T. (2003) Integrated Use of Biomarkers (Acetylcholinesterase and Antioxidant Enzymes Activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian Coastal Marine Area. *Mar. Poll. Bull.*, 46: 324-330.
- Lockridge, O., and Masson, P. (2000) Pesticides and Susceptible Populations: People with Butyrylcholinesterase Genetic Variants May be at Risk. *Neurotoxicol.*, 21: 113-126.
- Londoño, D. K., Siegfried, B. D., and Lydy, M. J. (2004) Atrazine Induction of a Family 4 Cytochrome P450 Gene in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere*, In Press.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randal, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Lundebye, A. K., Curtis, T. M., Braven, J., and Depledge, M. H. (1997) Effects of the Organophosphorous Pesticide, Dimethoate, on Cardiac and Acetylcholinesterase (AChE) Activity in the Shore Crab *Carcinus maenas*. *Aquat. Toxicol.*, 40: 23-36.
- Maki, T., Hosokawa, M., Satoh, T., and Sato, K. (1991) Changes in Carboxylesterase isozymes of Rat Liver Microsomes During Hepatocarcinogenesis IPN. *J. Cancer Res.*, 82: 800-806.
- Marcel, V., Palacios, L. G., Pertuy, C., Mason, P., and Fournier, D. (1998) Two Invertebrate Acetylcholinesterase Show Activation Followed by Inhibition with Substrate Concentration. *Biochem. J.*, 329: 329-334.
- Masson, P., Froment, M. T., Bartels, C., and Lockridge, O. (1996) Asp70 in the peripheral anionic site of human butyrylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.*, 235: 36-48.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., and Vallette, F.-M. (1993) Molecular and Cellular Biology of Cholinesterases. *Prog. Neurobiol.*, 41: 31-91.
- Matsumura, F. (1985). Toxicology of Insecticides, 2nd ed. *Plenum Press*, New York.
- Maycock, D. S., Prenner, M. M., Kheir, R., Morris, S., Callaghan, A., Whitehouse, P., Morrith, P., and Crane, M. (2003) Incorporation of in Situ and Biomarker Assays in Higher-tier Assessment of the Aquatic Toxicity of Insecticides. *Water Research.*, 37: 4180-4190.
- Maxwell, D. M., Brecht, K. M., Koplovitz, I., and Sweeney, R. E. (2006) Acetylcholinesterase Inhibition: Does it Explain the Toxicity of Organophosphorus Compounds. *Arch. Toxicol.*

- McCarthy, L., and Shugart, L. (1990) Biological Markers of Environmental Contamination. In biomarkers of Environmental Contamination (J. McCarthy and L. Shugart, Eds.), pp. 3-14. Lewis, Boca Raton, FL.
- McCracken, N. W., Blain, P. G., and Williams, F. M. (1993) Nature and Role of Xenobiotic Metabolizing Esterases in Rat Liver, Lung, Skin and Blood. *Biochem. Pharmacol.*, 45(1): 31-36.
- Meimberg, H. (1995) Untersuchungen über Detoxifizierende Enzyme Limnischer Gastropoden und ihre Induzierbarkeit. Thesis. Neuherberg-München: GSF.
- Myers, M., Richmond, R. C., and Oakeshott, J. G. (1988) On the origins of esterases. *Mol. Biol. Evol.*, 5: 113-119.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Morgado, F., Soares, A. M. V. M., and Guilhermino, L. (2005) Characterization of the Cholinesterases Present in Head Tissues of the Estuarine Fish *Pomatoschistus microps*: Application to Biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 62: 341-347.
- Moores, G. D., Devonshire, A. L., Denholm, I. (1988) A Microplate Assay for Characterising Insensitive Acetylcholinesterase Genotypes of Insecticide Resistant Insects. *Bull. Entomol. Res.*, 78: 537-541.
- Moores, G. D., Denholm, I., Byrne, F. J., Kennedy, G. G., and Devonshire, A. L. (1989) Characterising Acetylcholinesterase Genotypes in Resistant Insect Population. *Proc. Br. Crop. Prot. Conf.*, 1: 451-456.
- Mora, P., Miche, X., and Narbonne, J. F. (1999) Cholinesterase Activity as Potential Biomarker in Two Bivalves. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7: 253-260.
- Mori, M., Hosokawa, M., Ogasawara, Y., Tsukada, E., and Chiba, K. (1999) cDNA Cloning, Characterization and Stable Expression of Novel Human Brain Carboxylesterase. *FEBS Lett.*, 458: 17-22.
- Murphy, S. D. (1986) Pesticides. In: Doull, J., Klassen, C. D., Anders, M. O. (Eds.) The Basic Science of Poisons. MacMillan, New York, pp. 519-581.
- Nachmansohn, D., and Wilson, I. B. (1951) The Enzymic Hydrolysis and Synthesis of Acetylcholine. *Acta Enzymol.*, 12: 259-339.
- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubezé, M., Zeknini, A., Pellerin, J., Narbonne, J. F., and Moukrim, A. (1997) Use of Acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a Biomarker of Pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58: 901-908.
- Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C., and Nebert, D. W. (1996) P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers and Nomenclature. *Pharmacogenetics.*, 6: 1-42.
- O'Brien, R. D. (1960) Toxic Phosphorus Esters. Chemistry, Metabolism, and Biological Effects. *Academic Press.*, New York.

- Olsen, T., Ellerbeck, L., Fisher, T., Callaghan, A., and Crane, M. (2001) Variability in Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferase Activities in *Chironomus riparius* Meigen Deployed in Situ at Uncontaminated Field Sites. ***Environ. Toxicol. Chem.***, 20
- Ozretic, B., and Krajnovic-Ozretic, M. (1992) Esterase Heterogeneity in Mussel *Mytilus galloprovincialis*: Effects of Organophosphate and Carbamate Pesticides in vitro. ***Comp. Biochem. Physiol.***, 103 C: 221–225.
- Pan, G., and Dutta, H. M. (1998) The Inhibition of Brain Acetylcholinesterase Activity of Juvenile Largemouth Bass *Micropterus salmoides* by Sublethal Concentration of Diazinon. ***Environ. Res.***, 79: 133-137.
- Peters, L. D., Nasci, C., and Livingstone, D. R. (1998) Immunochemical Investigations of Cytochrome P450 forms/epitopes (CYP1A, 2B, 2E, 3A and 4A) in Digestive Gland of *Mytilus* sp. ***Comp. Biochem. Physiol.***, 121 C: 361-369.
- Poet, T. S., Wu, H., Kousba, A. A. and Timchalk, C. (2003) In vitro Rat Hepatic and Intestinal Metabolism of the Organophosphate Pesticides Chlorpyrifos and Diazinon. ***Toxicol. Sci.***, 72: 193-200.
- Porte, C., and Escartin, E. (1997) Cytochrome P450 System in the Hepatopancreas of the Red Swamp Crayfish *Procambarus clarkii*: a Field Study. ***Comp. Biochem. and Physiol.***, 121 C: 333-338.
- Rachinsky, T. L., Camp, S., Li, Y., Ekstrom, T. J., Newton, M., and Taylor, P. (1990) Molecular Cloning of Mouse Acetylcholinesterase: Tissue Distribution of Alternatively Spliced mRNA Species. ***Neuron.***, 5: 317-327.
- Ranson, H., Nikou, D., Hutchinson, M., Wang, C.W., Hemingway, J., and Collins, F. H. (2002) Molecular Analysis of Multiple Cytochrome P450 Gene From the Malaria Vector, *Anopheles gambiae*. ***Insect Mol. Biol.***, 11: 409-418.
- Rao, J. V., Pavan, Y. S., and Madhavendra, S. S. (2003) Toxic Effects of Chlorpyrifos on Morphology and Acetylcholinesterase Activity in the Earthworm, *Eisenia foetida*. ***Ecotoxicol. and Environ. Saf.***, 54: 296-301.
- Reily, L. A., Means, J. C., Yan, Z. M. and Winston, G. W. (1992) Induction of Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) in the Sandworm (*Nereis virens*) Exposed to Petroleum-Contaminated Sediment. Abstracts of 13th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Pensacola, Florida: ***Society of Environ. Toxicol. and Chem.***, 194
- Reiner, E. D. (1971) Spontaneous Reactivation of Phosphorylated and Carbamylated Cholinesterases. ***Bull. World Health Org.***, 44: 109-112.
- Reuveny, H., and Cohen, E. (2004) Evaluation of Mechanisms of Azinphos-Methyl Resistance in the Codling Moth *Cydia pomonella* (L.). ***Arc. of. Insect Biochem. and Physiol.***, 57: 92-100.

- Reynoldson, T. B., Van de Valk, D., Stervoski, L., and Thompson, S. (1987) Interactions Between Sediment Contaminants and Benthic Organisms. *Hydrobiol.*, 146: 53-66.
- Reynoldson, T., Thompson, S. P., and Bamsey, J. L. (1991) A Sediment Bioassay Using the Tubificid Oligochaeta Worm *Tubifex tubifex*. *Envir. Toxicol. Chem.*, 10: 1061-1072.
- Rodriguez-Fuentes, G., and Gold-Bouchot, G. (2004) Characterization of Cholinesterase Activity from Different Tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar. Environ. Res.*, 58: 505-509.
- Roex, E. W. M., Keijzers, R., and Van Gestel, C. A. M. (2003) Acetylcholinesterase Inhibition and Increased Food Consumption Rate in the Zebrafish, *Danio rerio*, After Chronic Exposure to Parathion. *Aquat. Toxicol.*, 64: 451-460.
- Ronis, M. J. J., and Hodgson, E. (1989) Cytochrome P450 Monooxygenases in insects. *Xenobiotica.*, 19: 1077-1092.
- Satoh, T., Hosokawa, M., Atsumi, R., Suzuki, W., Hokusui, H., and Nagai, E. (1994) Metabolic Activation of CPT-11, 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidinol] Carbonyloxycamptothecin, a Novel Antitumor Agent, by Carboxylesterase. *Biochem. Pharm. Bull.*, 17: 662-664.
- Satoh, T., and Hosokawa, M. (1995) Molecular Aspects of Carboxylesterase Isoforms in Comparison with Other Esterases. *Toxicol. Lett (Shannon).*, 82: 439-445.
- Satoh, T., and Hosokawa, M. (1998) The Mammalian Carboxylesterases: from Molecules to Functions. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 38: 257-288.
- Satoh, T. (2005) Toxicological Implications Esterases From Molecular Structures of Functions. *Toxicol. and Applied Pharmacol.*, 207: S11-S12.
- Scaps, P., Demuynck, S., Descamps, M., and Dhainaut, A. (1996) Biochemical and Enzymatic Characterization of a Acetylcholinesterase from *Nereis diversicolor* (Annelida: Polychaeta): Comparison with the Cholinesterases of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta). *Biol. Bull.*, 190: 396-402.
- Scott, J. G. (1999) Cytochromes P450 and Insecticide Resistance. *Insect. Biochem. Mol. Biol.*, 29: 757-777.
- Schenkman, L. B., and Cinti, D. L. (1978) Preparation of Microsomes with Calcium. *Methods in Enzimology.*, Vol. 52, pp. 83-89.
- Selkirk, M. E., Lazari, O., and Matthews, J. B. (2005) Functional Genomics of Nematode Acetylcholinesterases. *Parasitology.*, 131: S3-S18.
- Shi, M. A., Yuan, J. Z., Wu, J., Zhuang, P. J., Wu, X. F., and Tang, Z. H. (2002) Kinetic Analysis of Acetylcholinesterase in Propoxur-resistant Strains of Housefly (*Musca domestica*) from Shanghai, China. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 72: 72-82.

- Silva Filho, M. V., Oliveira, M. M., Salles, J. B., Cunha Bastos, V. L. F., Cassano, V. P. F., and Cunha Bastos, J. (2004) Methyl-paraoxon Comparative Inhibition Kinetics for Acetylcholinesterases from Brain of Neotropical Fishes. *Toxicol. Lett.*, 153: 247-254.
- Silver, A. (1974) The Biology of Cholinesterases. *Elsevier*, Amsterdam.
- Sogorb, M. A., and Vilanova, E. (2002) Enzymes Involved in the Detoxification of Organophosphorus, Carbamate and Pyrethroid Insecticides Through Hydrolysis. *Toxicol. Letters.*, 128: 215-228.
- Srinivas, R., Udikeri, S. S., Jayalakshmi, S. K., and Sreeramulu, K. (2004) Identification of Factors Responsible for Insecticide Resistance in *Helicoverpa armigera*. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 137 C: 261-269.
- Stanek, K., Drobne, D., and Trebše, P. (2006) Linkage of Biomarkers Along Levels of Biological Complexity in Juvenile and Adult Diazinon Fed Terrestrial Isopod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Chemosphere*, 64: 1745-1752.
- Stegeman, J.J. (1995) Diversity and Regulation of Cytochrome P450 in Aquatic Species, In Molecular Aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes: Their Significance in Environmental Toxicology, Chemical Carcinogenesis and Health, (Arinç, E., Schenkman, J. B. And Hodgson, E. Eds.), pp. 135-158. *Springer-Verlag, Heidelberg*.
- Stojan, J., Brochier, L., Alies, C., Colletier, J. P., and Fournier, D. (2004) Inhibition of *Drosophila melanogaster* Acetylcholinesterase by High Concentration of Substrate. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1364-1371.
- Sturm, A., and Hansen, P. D. (1999) Altered Cholinesterases and Monooxygenase Levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* Exposed to Environmental Pollutants. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, 42: 9-15.
- Sturm, A., Silva de Assis, H. C., and Hansen, P. D. (1999) Cholinesterases of Marine Teleost Fish: Enzymological Characterization and Potential Use in the Monitoring of Neurotoxic Contamination. *Mar. Environ. Res.*, 47: 389-398.
- Sultatos, L. G., and Murphy, S. D. (1983) Kinetic Analyses of the Microsomal Biotransformation of the Phosphorothioate Insecticides Chlorpyrifos and Parathion. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 3: 16-21.
- Sun, H., Pang, Y. P., Lockridge, O., and Brimijoin, S. (2002) Re-engendering Butyrylcholinesterase as a Cocaine Hydrolase. *Molecular Pharm.*, 62: 220-224.
- Sussman, J. L., Harel, M., Frolow, F., Oefner, C., Goldman, A., Toker, L., and Silman, I. (1991) Atomic Structure of Acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a Prototype Acetylcholine-binding protein. *Science.*, 253: 1872-879.
- Szabo, T., Lazar, G., Liboubam, S., Ravaille-Veron, M., Toth, P., and Brandle, K. (1992) Central Projections and Motor Nuclei of the Facial, Glossopharyngeal, and Vagus Nervous in the Mormyrid Fish (*Gnatnonemus petroei*). *J. Comp. Neurol.*, 15 (3): 43-58.

- Takayama, H., Watanabe, A., Hosokawa, M., Chiba, K., Satoh, T., and Aimi, N. (1998) Synthesis of New Class of Camptotecin Derivates The Long Chain Fatty Acid Esters of 10-hydroxycamptothecin, and a Potent Prodrug Candidate, and Their in vitro Metabolic Conversion by Carboxylesterases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8: 415-418.
- Talesa, V., Principato, E., Di Giovannini, M. V., Grauso, G., and Rosi, G. (1993a) Evidence for a Molecular Polimorphism of Cholinesterase in *Sepia officinalis* (Cephalopoda: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106 B: 557-562.
- Talesa, V., Principato, G. B., Giovannini, E., Di Giovannini, M. V., and Rosi, G. (1993b) Dimeric forms of Cholinesterases in *Sprinculus nudus*. *Eur. J. Biochem.*, 215: 267-275.
- Thompson, H. (1991) Serum 'B' Esterases as Indicators of Exposure to Pesticides. In: Mineau, P. (Ed.) Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment. *Elsevier*, Amsterdam, pp. 109-125.
- Timchalk, C. (2001) Organophosphate Pharmacokinetics. In *Handbook of Pesticide Toxicology* (Krieger, R., Doull, J., Ecobichon, D., Gammon, D., Hodgson, E., Reiter, L., and Ross, J., Eds.) Vol. 2, pp. 929-951. Academic Pres, San Diego.
- Timchalk, C., Nolan, R. J., Mendrala, A. L., Dittenber, D. A., Brzak, K. A., and Mattsson, J. L. (2002) A Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PBPK/Pharmacodynamic) Model for the Organophosphate Insecticide Chlorpyrifos in Rats and Humans. *Toxicol. Sci.*, 66: 34-53.
- Toutant, J.-P. (1989) Insect Acetylcholinesterase: Catalytic Properties, Tissue Distribution and Molecular Forms. *Progress in Neurobiol.*, 32: 423-446.
- Tovey, E. R., and Baldo, B. A. (1987) Comparison of Semidry and Conventional Tank Buffer Electrotransfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Membranes. *Electrophoresis.*, 8: 384-387.
- Varó, L., Navarro, J. C., Amat, F., and Guilhermino, L. (2002) Characterisation of Cholinesterases and Evaluation of the Inhibitory Potential of Chlorpyrifos and Dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia partenogenética*. *Chemosphere.*, 48: 563-569.
- Yamada, T., Hosokawa, M., Satoh, T., Moroo, I., Takahashi, M., Akatsu, H., and Yamamaoto, T. (1994) Immunohistochemistry With an Antibody to Human Liver Carboxylesterase in Human Brain Tissues. *Brain. Res.*, 658: 163-166 Hosokawa, M., Maki, T., and Satoh, T. (1987) Multiplicity and Regulation of Hepatic Microsomal Carboxylesterases in Rats. *Mol. Pharmacol.*, 31: 579-584.
- Yawetz, A., Manelis, R., and Fishelson, L. (1992) The Effects of Araclor 1254 and Petrochemical Pollutants on Cytochrome P450 from the Digestive Gland Microsomes of Four Species of Mediterranean Molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103 C: 607-614.

- Yi, M. Q., Liu, H. X., Shi, X. Y., Liang, P., and Gao, X. W. (2006) Inhibitory Effects of Four Carbamate Insecticides on Acetylcholinesterase of Male and Female *Carassius auratus* in vitro. *Comp. Biochem. and Physiol.*, 143 C: 113-116.
- Wang, J. J., Cheng, W. X., Ding, W., and Zhao, Z. M. (2004) The Effect of the Dichlorvos on Esterase Activity Extracted from the Psocids, *Liposcelis bostrychophila* and *L. entomophila*. *Journ. of Inscet. Sci.*, 4: 23-28.
- Weiss, C. M. (1964) Detection of Pesticides in Water by Biochemical Assays. *J. Wat. Pollut. Ctrl. Fed.*, 36: 240-253.
- West, A. J., and McCaffery, A. R. (1992) Evidence of Nerve Insensitivity to Cypermethrin From Indian Strains of *H. armigera*. *Proc. Brighton Crop Prot. Conf. Pests Dis.*, 3: 233-238.
- Wheelock, C. E., Miller, J. L., Miller, M. G., Shan, G., Gee, S. J., and Hammock, B. D. (2004) Development of Toxicity Identification Evaluation (TIE) Procedures for Pyrethroid Detection using Esterase Activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 2699-2708.
- Wheelock, C. E., Eder, K. J., Werner, I., Huang, H., Jones, P. D., Brammell, B. F., Elskus, A. A. and Hammock, B. D. (2005) Individual Variability in Esterase Activity and CYP1A Levels in Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Exposed to Esfenvalerate and Chlorpyrifos. *Aquat. Toxicol.*, 74:172-192.
- Wilson, I. B., and Cabib, E. (1956) Acetylcholinesterase: Enthalpies and Entropies of Activation. *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 202-207.
- WHO, World Health Organization, (1986b) World Health Organization Metabolism and mode of Action. Organophosphorus Insecticides: a General Introduction. *WHO*, Geneva, pp. 39-48.
- WEB_1. (03.07.2006). Kurt Giles Home Page.
<http://www.hallym.ac.kr/~neuro/kns/tutor/che.html> (04.07.2006).
- WEB_2. (2006).<http://webhost.ua.ac.be/ebt/research/bioaccumtox.htm> (07.04.2006).
- Zinkl, J. G., Shea, P. J., Nakamoto, R. J., and Callman, J. (1987) Effects of Cholinesterases of Rainbow Trout Exposed to Acephate and Metamidophos. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 38, pp. 22-28.

ÖZGEÇMİŞ

SOYADI	ÖZDEMİR
ADI	Adile
DOĞUM TARİHİ	13 Ekim 1980
GÖREVİ	Araştırma Görevlisi
ÜNVANI	Araştırma Görevlisi
ADRESİ	Biyoloji Bölümü Fen Edebiyat Fakültesi Pamukkale Üniversitesi 20017 Denizli, Türkiye
TEL	+90-258-213-4030/1466
FAX	+90-258-212-5546
EMAIL	aozdemir@pamukkale.edu.tr adile45@yahoo.com

EĞİTİM DURUMU

2003-	Yüksek Lisans: Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Pamukkale Üniversitesi (PAÜ) Denizli, Türkiye
2002-2003	Tezsiz Yüksek Lisans: Fen Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim Alan Öğretmenliği Pamukkale Üniversitesi (PAÜ) Denizli, Türkiye
1998-2002	Lisans: Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Ege Üniversitesi (EGE) İzmir, Türkiye