

İsrail Sazanı (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) Balıklarına Uygulanan Cypermethrin'in Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Etkileri

Hamit USLU^{1*}, Gözde ATILA², Yusuf ERSAN³, Zaide ÖZDEN⁴

¹ Kafkas Üniversitesi, Atatürk Sağlık Hizmetleri MYO, Sağlık Bakım Hizmetleri Bölümü, KARS

² Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji AD, KARS

³ Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KARS

⁴ Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, KARS

Geliş tarihi/Received 19.08.2015

Düzeltilerek geliş tarihi/Received in revised form 18.12.2015

Kabul tarihi/Accepted 25.12.2015

Özet

Bu çalışmada 96 saat boyunca düşük ($1 \mu\text{gL}^{-1}$), orta ($1.5 \mu\text{gL}^{-1}$) ve yüksek ($2 \mu\text{gL}^{-1}$) dozlarda Cypermethrin maruziyetinde *Carassius gibelio*'nun karaciğer, böbrek ve kas gibi farklı dokuları ile serum örneklerindeki oksidatif stres belirteçlerinden olan Malondialdehit (MDA) ile Glutasyon (GSH) ve Süperoksit Dismutaz (SOD) gibi antioksidanların seviyelerinin değişikliklerini belirlemek amaçlanmıştır. Bulgular MDA'nın karaciğer ve kas dokuları (tüm gruplarda; $p < 0.001$ düzeyinde) ile serum örneklerinde (sırasıyla; $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$) önemli şekilde artırdığını göstermiştir. SOD seviyelerinin karaciğer (sırasıyla; $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) ve kas dokuları (orta ve yüksek dozlarda; $p < 0.001$ düzeyinde) ile serum örneklerinde (yüksek dozda; $p < 0.01$ düzeyinde) önemli şekilde azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca GSH seviyelerinin de kas (sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.05$) ve serum örneklerinde (yüksek dozda; $p < 0.01$ düzeyinde) önemli şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Böbrek dokusunun oksidan ve antioksidan seviyelerinde önemli bir değişiklik gözlemlenmedi ($p > 0.05$). Cypermethrin gibi pestisitlerin kontrolsüz, bilinçsiz ve gereksiz kullanımı çevre ve halk sağlığında ciddi tehlikelere yol açabilmektedir. Bu çalışmanın sonuçları kısa süreli Cypermethrin maruziyetinde bile oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengede oldukça önemli bozulmalar olduğunu göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan, Oksidan, Oksidatif stres, *Carassius gibelio*, Cypermethrin

The Effect Of Cypermethrin On Oxidative Stress Parameters In Israeli carp (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) Fish

Abstract

The present study was aimed to determine changes in the levels of oxidative stress markers such as Malondialdehyde (MDA) and the antioxidant levels such as Glutathione (GSH) and Superoxide Dismutase (SOD) in different organs such as liver, kidney, muscle, and serum samples of *Carassius gibelio* exposure to low ($1 \mu\text{gL}^{-1}$), middle ($1.5 \mu\text{gL}^{-1}$) and high ($2 \mu\text{gL}^{-1}$) doses Cypermethrin for 96 h. The results showed significant increase in MDA of the liver and muscle tissues ($p < 0.001$ level in all groups) with serum samples ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$ respectively). SOD levels was determined that the significant decrease in liver ($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectively), muscle tissues ($p < 0.001$ level in medium and high doses) and serum samples ($p < 0.01$ level in high dose). Moreover GSH levels was detected that significant decrease in the muscle ($p < 0.001$, $p < 0.001$,

* Hamit USLU, hamit_uslu@hotmail.com, Tel: (0549) 668 07 04

$p < 0.05$ respectively) and serum samples ($p < 0.01$ level in high doses). We did not observe a significant difference of the oxidant and antioxidants levels in the kidney tissue ($p > 0.05$). The uncontrolled, insensible and unnecessary usage of pesticides such as Cypermethrin can be use serious hazard to the environment and public health. The result of the study showed that the very important corruption balance between oxidants and antioxidants depend on Cypermethrin exposed even in short period.

Keywords: Antioxidant, Oxidant, Oxidative stress, *Carassius gibelio*, Cypermethrin

1. Giriş

Balıklar insanlar için önemli bir protein kaynağıdır (Chakraborty vd., 2007). Balıklar çevre kirliliğine neden olan maddelere (pestisit, ağır metaller, endüstri atıkları, yapay ve doğal tarımsal gübreler vb.) maruz kaldığında sağlığa zararlı hale gelmektedirler. Bu kirlenmeler arasında yer alan pestisitlerin aşırı ve bilinçsizce kullanılması sonucu çevre ve su kaynaklarında önemli kirlenmeler meydana gelmektedir. Oluşan bu kirliliklerden akuatik hayat direkt, insan hayatı ise indirekt olarak etkilenmektedir (Hill, 1989). Pestisit kontaminasyonu sulara oksijen kıtlığına, balık ve diğer su canlılarında kitlesel ölümlere yol açmaktadır (Çelikel, 2011). Pestisitlerin toksikasyon mekanizmalarından biri olan lipit peroksidasyonu sonucu MDA ve TBARS düzeyleri artmakta bu nedenle de bu parametreler oksidatif stresin belirteçleri olarak kullanılmaktadır (Kehrer, 1993). Lipit peroksidasyonu hücrelerde antioksidan enzim sistemlerini etkilemek suretiyle hücre hasara neden olan bir olaydır (Kehrer, 1993).

Sarımsı kahverengi renkte ve sıvı halde bulunan Cypermethrin Tip II piretroidlerden en yaygın kullanılanıdır (Bradbury ve Coats, 1989a). Cypermethrin zirai mücadele dışında veteriner hekimlikte de sığır, koyun, kümes hayvanları ile Atlantik sombalığı (*Salmo salar* Linnaeus, 1758) yetiştiriciliğinde ektoparaziter mücadelede kullanılmaktadır (Richards, 1983; Roth vd., 1993; Hard vd., 1997; Treasurer ve Wartsworth, 2004). Cypermethrin gibi toksik kimyasal kirlenmelere maruz kalındığında serbest radikal üretimi artmaktadır. Ancak normal fizyolojik koşullarda hem balıklarda hem de diğer omurgalılarda oluşan serbest radikaller antioksidan enzimler tarafından hızlı bir şekilde elimine edilmektedir

(Valanidis vd., 2006; Jin vd., 2011). Oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin bozulmasıyla oksidatif stres tablosu ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda balık ve midyelerdeki antioksidan seviyelerin akuatik kirlenmeyi belirlemede parametre olarak kullanılabileceği ifade edilmektedir (Cossu vd., 2000; Franco vd., 2006). Cypermethrin'in balıklar için çok toksik bir madde olduğu ve 96 saatlik LD50 dozunun 0.4-2.8 µg/l aralığında bulunduğu birçok araştırmacı (Sthephanson, 1982; Sarkar vd., 2005; Velisek vd., 2006) tarafından belirtilmektedir. Ayrıca Bradbury ve Coats (1989b) çeşitli piretroidlerin Gökkuşluğu Alabalığı'nda yarılama ömrünün 48 saatten fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan literatür taramalarında Cypermethrin'in *Carassius gibelio* türü üzerine etkileri hakkındaki bilgilerin oldukça sınırlı olması, ayrıca hem Çıldır Gölü'ndeki dominant tür olması hem de Türkiye genelinde yayılım göstermesi sebebiyle bu çalışmada Cypermethrin'in değişik dozlardaki akut toksikasyonunun balıkların serum, kas, karaciğer ve böbrek dokularındaki oksidan ve antioksidan enzim düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntem

Cyprinidae familyasının bir üyesi olan *Carassius gibelio* (Bloch, 1782) tüm Türkiye iç sularında olduğu gibi Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da da yayılım göstermektedir (Specziar vd., 1997). Omnivor olan bu tür ekonomik değeri çok fazla olmasa da doğal su kaynaklarından avcılığı yapılan bir türdür (Specziar vd., 1997; Dağtekin ve Baştürk, 2014).

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 2014/018 sayılı izni ile yapıldı. Çıldır Gölü'nden canlı olarak yakalanan *Carassius gibelio* türü balıklar oksijen düzeyi ayarlanmış su dolu tanklarda Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne getirildi. 40 adet balık her grupta 10 balık olacak şekilde 200 litrelik tanklarda 4 gruba ayrıldı.

- 1. Kontrol grubu;** herhangi bir uygulama yapılmadı.
- 2. Düşük doz grubu;** 1 µg L⁻¹ dozunda Cypermethrin
- 3. Orta doz grubu;** 1.5 µg L⁻¹ dozunda Cypermethrin
- 4. Yüksek doz grubu;** 2 µg L⁻¹ Cypermethrin uygulandı.

Tüm gruplardaki balıklar çalışmaya başlamadan önce 5 gün adaptasyon sürecine bırakıldı. 96 saat süresince Cypermethrin (7.5 g / 100 ml Biyotoks) yukarıdaki prosedüre uygun olarak yaşadıkları suya katılmak suretiyle uygulandı. Çalışma süresince su sıcaklıklarının 25±5 °C ve gece gündüz periyodununun 12/12 olması sağlandı. Balıklar çalışma süresince düzenli olarak ticari yem ile beslendi.

Çalışma sonunda balıkların kaudal veninden kan alınmasını takiben kas, karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Alınan doku örnekleri laktatlı ringer solüsyonu ile yıkandıktan sonra polietilen poşetlere sarılıp etiketlenerek analizlere kadar -20 °C'daki deep freeze'de saklandı. Serum, kas, karaciğer ve böbrek dokularında SOD düzeyleri kit kullanılarak (Sigma-Aldrich Code 19160), GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay (1968) ve MDA düzeyleri ise Placer vd. (1966)'nin yöntemlerine göre belirlendi. Araştırmada elde edilen verilerin biyoistatistiksel olarak değerlendirilmesi için SPSS 18 paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki değişkenlerin değerlendirilmesi için Tek Yönlü Varyans Analizi (Anova) ve

Tukey testi uygulandı. p<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

Cypermethrin uygulanan bütün grupların karaciğer dokularının MDA düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla önemli bir şekilde arttığı gözlemlendi (p<0.001). Buna karşın SOD seviyelerinin düşük, orta ve yüksek doz uygulanan gruplarda önemli şekilde azaldığı belirlendi (sırasıyla p<0.05, p<0.01, p<0.001). GSH düzeylerinde ise önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (p>0.05) (Tablo 1).

Kas dokusunun MDA düzeyleri tüm gruplarda kontrole oranla önemli şekilde artarken (p<0.001), GSH düzeyleri ise düşük, orta ve yüksek doz gruplarında önemli şekilde azaldığı belirlendi (sırasıyla p<0.001, p<0.001, p<0.05). Yine benzer şekilde SOD seviyelerinin de orta ve yüksek doz Cypermethrin uygulanan gruplarda önemli şekilde azaldığı gözlemlendi (p<0.001) (Tablo 1).

Serum örneklerinde düşük, orta ve yüksek doz gruplarında MDA seviyelerinin önemli şekilde yükseldiği, (sırasıyla p<0.01, p<0.001, p<0.001) GSH ve SOD enzim seviyelerinin ise yüksek doz madde uygulanan grupta istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı tespit edildi (p<0.01). Bunun yanı sıra böbrek dokusunda MDA düzeyleri ile GSH ve SOD enzim düzeylerinde önemli bir değişiklik belirlenmedi (p>0.05) (Tablo 1).

4. Tartışma

Lipit peroksidasyonu oksidatif stresin önemli bir belirteci olup yaygın olarak kullanılmaktadır (Huggett vd., 1992). Bu nedenle akuatik kirleticilere maruz kalınması neticesinde lipit peroksidasyonunun (MDA) belirlenmesi faydalı olabilmektedir (Köprücü vd., 2010). Yapılan bu çalışmada Cypermethrin uygulamasına bağlı olarak lipit peroksidasyonunun hedef dokularından olan karaciğer ve kas ile serum örneklerinde MDA seviyelerinin önemli oranda arttığı belirlendi.

Tablo 1. Çalışma gruplarının MDA (nmol/ml), SOD (U/ml) ve GSH (µmol/ml) düzeyleri.

		Kontrol	Düşük Doz	Orta Doz	Yüksek Doz
KARACİĞER	MDA	1.15±0.06	1.63±0.12***	1.64±0.07***	1.92±0.21***
	SOD	134.17±2.93	125.24±5.10*	122.31±6.89**	112.85±7.19***
	GSH	1.23±0.15	1.23±0.24	1.00±0.17	1.28±0.25
KAS	MDA	2.00±0.15	2.68±0.29***	2.73±0.20***	2.73±0.08***
	SOD	118.71±5.14	116.97±8.61	91.67±11.51***	87.15±11.76***
	GSH	0.88±0.01	0.81±0.02***	0.81±0.04***	0.83±0.03*
BÖBREK	MDA	5.49±0.95	4.98±1.90	4.19±0.70	4.03±0.92
	SOD	136.52±5.14	137.10±3.17	128.33±10.83	131.93±7.04
	GSH	1.04±0.04	0.99±0.03	0.99±0.08	1.06±0.07
SERUM	MDA	1.09±0.003	1.44±0.10**	1.63±0.09***	1.87±0.25***
	SOD	127.02±1.19	120.83±2.58	120.83±3.33	116.54±6.22**
	GSH	0.77±0.07	0.78±0.12	0.61±0.13	0.48±0.11**

Kontrol grubuyla madde verilen gruplar kıyaslandığında;
p<0.05 : *, p<0.01 : **, p<0.001 : ***

Ayrıca serbest radikal düzeylerindeki artış ile apoptoz sinyallerindeki değişim arasında oldukça önemli bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Livingstone, 2001; Zhao vd., 2009). Shashikumar ve Rajini (2010) Cypermethrin'in 1, 5 ve 25 mM düzeylerindeki subletal dozlarına 4 saat süresince maruz bırakılan *Caenorhabditis elegans* (iplik kurdu)'ta reaktif oksijen türlerinin (ROS) önemli şekilde arttığı buna karşın SOD, GSH ve GPx (Glutatyon Peroksidaz) seviyelerini önemli ölçüde azalttığını ifade etmişlerdir. Köprücü vd. (2010) Cypermethrin maruziyeti sonucu midyelerin sindirim bezleri ile solungaçlarında GSH ve CAT seviyelerinin önemli şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Giray vd. (2001)'de sıçanlara oral olarak verilen değişik dozlardaki Cypermethrin'in beyin ve karaciğer dokularında oksidatif stresi arttırdığını bunun yanı sıra GSH seviyelerini ise önemli şekilde azalttığını belirlemişlerdir. Mevcut çalışmada da serum, karaciğer ve kas dokularındaki SOD seviyelerinin doza bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı tespit edildi. Kas GSH düzeylerinde tüm deneme gruplarında serum GSH düzeyinde ise yalnızca yüksek doz Cypermethrin uygulanan grupta önemli oranda azalma belirlendi.

Cypermethrin'in yaygın şekilde kullanılan bir pestisit olduğu ve etkisini de diğer piretiroidlerde olduğu gibi yapısındaki cyano-3-phenoxybenzyl grupları sayesinde gösterdiği bilinmektedir. Bu gruplar

nöronlardaki sodyum kanallarını inhibe ederek depolarizasyon fazının uzamasına neden olurlar (Bradbury ve Coats, 1989b; Hayes, 1994). Ayrıca GABA reseptörleri (Bradbury ve Coats, 1989b; Hayes, 1994) ile klor ve kalsiyum kanalları üzerinde de etkileri olabileceği ifade edilmektedir (Burr ve Ray, 2004).

Sonuç olarak; oldukça yaygın şekilde kullanılan bir pestisit olan Cypermethrin'in 96 saat gibi kısa bir süre zarfında bile lipit peroksidasyonunu artırmak ve antioksidan savunma sistemlerini inhibe etmek suretiyle canlıda ciddi boyutlarda oksidatif strese neden olduğu belirlenmiştir.

5. Kaynaklar

- Boxaspen, K., ve Holm, J.C., 2001. The development of pyrethrum-based treatments against the ectoparasitic salmon lice *Lepeophtheirus salmonis* in sea cage rearing of Atlantic salmon *Salmo salar* L, Aquaculture Research, 32 (9): 701–707.
- Bradbury, S.P., ve Coats, J.R., 1989a. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 108: 134–177.

- Bradbury, S.P., ve Coats, J.R., 1989b. Toxicokinetics an toxicodynamics of pyrethroid insecticides in fish, Environmental Toxicology and Chemistry, 8 (5): 373–380.
- Burr, S.A., ve Ray, D.E., 2004. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels, Toxicological Sciences, 77 (2): 341-6.
- Chakraborty, K., Joseph, D., Stephy, P.S., Chakkalakal, S. J., Joy, M. ve Raola, V. K., 2014. Inter annual variability and seasonal dynamics of amino acid, vitamin and mineral signatures of ribbon fish, *Trichiurus lepturus* (Linnaeus, 1758), International Food Research Journal, 21 (5): 2007–2016.
- Cossu, C., Doyotte, A., Babut, M., Exinger, A., ve Vasseur, P., 2000. Antioxidants biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments, Ecotoxicology and Environmental Safety, 45: 106–121.
- Çelikel, Y., 2011. Alpha-Cypermethrin'in *Daphnia magna* (Straus 1820) (Cladocera, Crustacea) üzerine akut toksik etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Ankara, 57s.
- Dağtekin, B.B., ve Baştürk, Ö., 2014. Çıldır Gölü'nde Yaşayan Gümüşü Havuz Balıklarının (*Carassius gibelio* Bloch, 1782) Et Verimi ve Biyokimyasal Kompozisyonu, Yunus Araştırma Bülteni, 2: 15–22.
- Franco, J.L., Trivella, D.B.B., Trevisan, R., Dinslaken, D.F., Marques, M.R.F., Bairy, A.C.D., ve Dafre, A.L., 2006. Antioxidant status and stress proteins in the gills of the brown mussel *Perna perna* exposed to zinc, Chemico-Biological Interactions, 160 (3): 232–240.
- Giray, B., Gürbay, A., ve Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol, Toxicology Letters, 118: 139–146.
- Hart, J.L., Thacker, J.R.M., Braidwood, J.C., Fraser, N.R., ve Matthews, J.E., 1997. Novel cypermethrin formulation for the control of sea lice on salmon (*Salmo salar*), Veterinary Records, 140 (7): 179–181.
- Hayes, A.W., 1994. Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition, New York, Raven Press, 435p.
- Hill, J.R., 1989. Aquatic organisms and pyrethroids, Pesticide Science, 27 (4): 429–465.
- Huggett, R.J., Kimerle, RA., Mehrle, P.M., ve Bergman, H.L., 1992. Biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis.
- Jin, Y., Zheng, S., Pu, Y., Shu, L., Sun, L., Liu, W., Fu, Z., 2011. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*), Chemosphere, 82 (3): 398–404.
- Kehrer, J.P., 1993. Free radicals as mediators of tissue injury and disease, Critical Reviews in Toxicology, 23 (1): 21–48.
- Köprücü, K., Yonar, S.M., ve Şeker, E., 2010. Effects of cypermethrin on antioxidant status, oxidative stress biomarkers, behavior, and mortality in the freshwater mussel *Unio*

- elongatulus eucirrus*, Fisheries Science, 76 (3): 1007–1013.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, Marine Pollution Bulletin, 42 (8): 656–666.
- Placer, Z.A., Cushman, L.L., ve Johnson, B.C., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems, Analytical Biochemistry, 16: 359–64.
- Richards, R.H., 1983. Diseases of farmed fish: Salmonids, Veterinary Records, 112 (6): 124–126.
- Roth, M., Richards, R.H., ve Sommerville, C., 1993. Current practices in the chemotherapeutic control of sea lice infestations in aquaculture: a review, Journal of Fish Diseases, 16 (1): 1–26.
- Sarkar, B., Chatterjee, A., Adhikari, S., Ayyappan, S. 2005. Carbofuran- and cypermethrin-induced histopathological alterations in the liver of *Labeo rohita* (Hamilton) and its recovery, Journal of Applied Ichthyology, 21: 131–135.
- Sedlak, J., ve Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, Analytical Biochemistry, 25: 192–205.
- Shashikumar, S., ve Rajini, P.S., 2010. Cypermethrin-induced alterations in vital physiological parameters and oxidative balance in *Caenorhabditis elegans*, Pesticide Biochemistry and Physiology, 97: 235–242.
- Specziar, A., Tolg, L., Biro, P., 1997. Feeding strategy and growth cyprinids in the littoral zone of Lake Balaton, Journal of Fish Biology, 51: 1109–1124.
- Sthephanson, R.R., 1982. Aquatic toxicology of cypermethrin I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests, Aquatic Toxicology, 2: 175–185.
- Treasurer, J.W., ve Wadsworth, S.L., 2004. Interspecific comparison of experimental and natural routes of *Lepeophtheirus salmonis* and *Caligus elongatus* challenge and consequences for distribution of chalimus on salmonids and therapeutant screening, Aquaculture Research, 35 (8): 773–783.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., ve Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants, Ecotoxicology and Environmental Safety, 64: 178–189
- Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z., Dobsikova, R., Novotny, L., Dudzik, M., 2006. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Veterinarni Medicina, 51 (10): 469–476.
- Zhao, M., Zhang, Y., Wang, C, Fu, Z., Liu, W., ve Gan, J., 2009. Induction of macrophage apoptosis by an organochlorine insecticide acetofenate, Chemical Research in Toxicology, 22 (3): 504–510.