

# Neonikotinoid insektisit thiamethoxamın *Oreochromis niloticus*'ta oksidatif stres parametreleri üzerine etkisi

Özgür FIRAT<sup>1,\*</sup>, Tüzin AYTEKİN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adıyaman Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adıyaman

<sup>2</sup>Çukurova Üniversitesi, İmamoğlu Meslek Yüksekokulu, Adana

Geliş Tarihi (Recived Date): 23.01.2018

Kabul Tarihi (Accepted Date): 24.05.2018

## Özet

Araştırmamızda neonikotinoid insektisit olan thiamethoxamın toksik etkileri, Nil tilapyası *Oreochromis niloticus*'ta oksidatif stres parametreleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla balıklar 4 ve 14 günlük sürelerle 60 ve 120 mg/L thiamethoxam etkisine bırakılmış ve solungaç ve bağırsak dokularındaki katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri ile glutatyon (GSH) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri belirlenmiştir. Thiamethoxamın etkisinde özellikle de yüksek ortam derişiminde CAT aktivitesinde solungaç ve bağırsak dokularında 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış; 14 günlük süre sonunda ise solungaç dokusunda anlamlı bir azalış belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). SOD aktivitesi solungaçta her iki etki süresi sonunda insektisidin düşük ve yüksek ortam derişimlerinde; bağırsakta ise 14 günlük süre sonunda ve yüksek ortam derişiminde artış göstermiştir ( $P<0.05$ ). GSH düzeyi özellikle de 120 mg/L thiametoxam etkisinde her iki dokuda da 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış; 14 günlük süre sonunda ise önemli bir azalış göstermiştir ( $P<0.05$ ). Solungaç ve bağırsak dokularındaki MDA düzeyi ise, 14 günlük süre sonunda thiametoxamın yüksek ortam derişiminde önemli düzeyde artmıştır ( $P<0.05$ ). Sonuç olarak çalışmamız, thiametoxamın özellikle de yüksek ortam derişiminde *O. niloticus*'ta oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir.

**Anahtar kelimeler:** *Oreochromis niloticus*, pestisit, thiamethoxam, antioksidan parametreler, malondialdehit.

\* Özgür FIRAT, ofirat@adiyaman.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0002-9683-8945>

Tüzin AYTEKİN, tuzunay@cu.edu.tr, <https://orcid.org/0000-0003-2666-0798>

## Effect of neonicotinoid insecticide thiamethoxam on oxidative stress parameters in *Oreochromis niloticus*

### Abstract

*In our study, toxic effects of thiamethoxam, a neonicotinoid insecticide, were investigated by oxidative stress parameters in Nile tilapia, Oreochromis niloticus. For this purpose fish were exposed to 60 and 120 mg/L thiamethoxam for 4 and 14 days and activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and levels of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in the gill and intestine were determined. In exposure of thiamethoxam especially in its higher medium concentration, it was determined a significant increase in CAT activities of gill and intestine tissues after 4 days and a significant decrease in its activity of gill after 14 days (P<0.05). SOD activity elevated in gill in all the tested concentrations of thiamethoxam after both exposure periods and in intestine in its higher concentration at 14 days (P<0.05). In both gill and intestine tissues, especially in higher medium concentration of thiamethoxam GSH levels indicated significantly an increase after 4 days and a decline after 14 days (P<0.05). MDA levels in the both tissues significantly elevated in exposed to higher concentration of thiamethoxam at the end of the exposure period (P<0.05). In conclusion the present research showed that exposure of thiamethoxam, especially its higher concentration, caused oxidative stress in O. niloticus.*

**Keywords:** *Oreochromis niloticus, pesticide, thiamethoxam, antioxidant parameters, malondialdehyde.*

### 1. Giriş

Pestisitler tarımsal aktivitelerde kullanılan toksik bileşiklerin en önemli sınıflarından biridir. Tarımsal amaçlarla kullanılan pestisitler yüzey suları aracılığıyla sucul ekosistemlere girmekte, akuatik organizmalarda çok ciddi zararlara ve hatta ölümlere bile neden olmaktadır. Akuatik canlıların dokularındaki özellikle pestisitleri içeren kirleticilerin biyobirikimi insanların tüketimi açısından da çok zararlıdır.

Tarımsal uygulamalarda sürekli ve yaygın olarak aynı insektisitlerin kullanılması böcek türlerinin zamanla bu insektisitlere karşı duyarlılığını kaybederek dirençli duruma gelmesine neden olmakta ve bu da bu kimyasalların sürekli olarak yenilenme gereksinimini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle uzun yıllardır kullanımlarına bağlı olarak organoklorlu, organofosforlu ve karbamat türü insektisitlerin azalan etkinliğine bağlı olarak tarımsal uygulamaları zamanla azalmış ve bu kimyasallara alternatif olarak piretroitler ve daha sonraları da neonikotinoid türü insektisitler geliştirilmiştir [1].

Neonikotinoidler, insektisitlerin yeni bir sınıfı olup 30 yıldır tarımsal uygulamalarda kullanılmaktadır. Son 20 yıldır da bu kimyasallar, dünya çapında insektisitlerin diğer bilinen en önemli majör sınıflarına (organoklorlu, organofosforlu, karbamat ve piretroitler gibi) karşın daha çok kullanılan ve en hızlı büyüyen tarım ilaçları haline gelmiştir [2, 3]. Bu insektisitler özellikle de tohumların sağlıklı gelişiminde tohum ilaçları olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Günümüzde neonikotinoidler

120'den fazla ülkede insektisit olarak kullanılmaktadır. 2008 yılında bu kimyasalların, dünyadaki total insektisit kullanımının %24'nü, tohumlar için kullanılan ilaçların ise %80'ini oluşturduğu hesap edilmiştir. Neonikotinoidler, organofosforlu ve karbamat insektisitlerin yerine geçebilecek potansiyele sahip ve kullanımları dünya çapında sürekli olarak artan etkili kimyasallar olarak ifade edilmektedir [2].

Thiamethoxam [3-(2-chloro-thiazol-5ylmethyl)-1,3,5-oxadiazinan-4-yliden-N-nitroamine] neonikotinoid bir insektisit olup yeni üretilen sentetik insektisitlerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır [4]. Bu insektisit, thianikotinil alt grubunda bulunan ikinci nesil bir nikonitik insektisittir. Thiamethoxamın tarım ürünlerini korumak için birçok emici ve ısıricı zararlı böceklere karşı geliştirilmiş dünya çapında kullanılan en yararlı insektisitlerden birini oluşturduğu belirtilmektedir [5]. Bu insektisit ilk defa 1991 yılında tarım ilaçları pazarına dahil olmuştur. Günümüzde ise thiamethoxam, imidakloprid ve clothianidin gibi en önemli neonikotinoid insektisit türleri, bal arılarına olan toksisitelerinin belirlenmesiyle ciddi bir şekilde tartışılmaktadır [6]. Bu nedenle son zamanlarda bu insektisitlerin kullanımının kısıtlanması talep edilmektedir [7]. Thiamethoxam, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından üçüncü dereceden tehlikeli bir kimyasal olarak ifade edilmektedir [8].

Pestisitleri de içeren çoğu çevresel kirleticiler balıklarda oksidatif stres oluşturma yeteneğine sahiptir. Son çalışmalarda da balıklardaki pestisit toksisitesinin bir sonucu olarak artan reaktif oksijen türlerinin (ROT) oksidatif hasara yol açtığı gösterilmiştir [9]. Oksidatif stres genotoksik etkilere, lipid peroksidasyonuna ve enzim inhibisyonlarına neden olarak hücre ve canlı yaşamını oldukça olumsuz etkilemektedir. Diğer yüksek yapılı organizmalarda olduğu gibi balıklarda da bu oluşan oksidatif stresle baş etmek için önemli savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Genel olarak antioksidan adı verilen bu savunma mekanizması balıkların hayatta kalma ve kimyasal stresine uyum göstermede önemli roller oynamaktadır. Antioksidan savunma sistemleri süperoksit dizmutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimatik ve glutatyon (GSH) ve metallothionein gibi enzimatik olmayan bileşenlerden oluşmaktadır [10]. SOD ve CAT pestisitlere karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturan önemli antioksidan enzimler olarak atfedilmektedir. GSH (L- $\gamma$ -glutamil-sistenil-glisin), SOD ve CAT gibi hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyan önemli bir enzimatik olmayan antioksidan moleküldür. Pestisitlerin toksik etkilerinden biri de lipid peroksidasyonuna yol açmalarıdır. Hücre zarlarının yapısal ve işlevsel bütünlüğünün bozulmasına neden olan lipid peroksidasyonu oksidatif stresin önemli belirteçlerinden biridir ve malondialdehit (MDA) düzeylerinin ölçülmesiyle gösterilebilmektedir [11].

Nil tilapyası *O. niloticus* dünyada en geniş şekilde kültürü yapılan tatlı su balıklarında biri olup omnivor olarak beslenirler ve eurihalindirler. Güçlü bir immün sisteme sahip olan bu balıklar hastalıklara ve çevresel kirleticilere karşı oldukça dirençlidirler. Yetiştiriciliğinin kolay olması, çevresel şartlara karşı dayanıklılığı, kirleticilerin kontamine olduğu sulara yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve insanların birinci dereceden besin kaynağı olması nedeniyle akuatoksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanıldıklarından sunulan bu araştırma için de model organizma olarak seçilmiştir.

Su ortamlarını kontamine eden insektisitler yalnızca balıklarda toksik etkilere neden olmaz besin zinciri yoluyla daha üst trofik düzeydeki canlıları ve hatta insanları bile olumsuz etkileyebilmektedirler. Bu nedenle bu kirleticilerin sucül ekosistemlerde ve

içinde yaşayan canlılardaki etkilerini araştırmak hem balıkların hem de ekosistemin geleceği açısından oldukça önemlidir. İnsektisitler her ne kadar tarımsal ürün verimliliğini ve kalitesini artırmak gibi amaçları gerçekleştirmek için üretilmiş olsalar da bu kimyasalların çevre dostu olmadıkları birçok çalışmada gösterilmiştir. Sunulan bu araştırmada neonikotinoid bir insektisit olan thiamethoxamın tatlı su balığı *Oreochromis niloticus*'taki oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla insektisit etkisine bırakılan balıkların solungaç ve bağırsak dokularındaki SOD ve CAT aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeyleri belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve yöntem

Sunulan çalışma için gerekli Etik Kurul onayı Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınmıştır (Karar No:6, Tarih: 27.07.2015). Balıklar, Çukurova Üniversitesi (Ç.Ü.) Su Ürünleri Fakültesi bünyesindeki balık yetiştirme havuzlarından alınmış ve Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Ekofizyoloji laboratuvarına getirilerek içerisinde 120 L bekletilmiş çeşme suyu bulunan 40x140x40 cm ebatlarındaki 6 stok cam akvaryumda ortam koşullarına uyumları için üç ay süre ile bırakılmışlardır. Bu sürede deneyde kullanılacak balıklar  $10.89 \pm 0.41$  cm boy ve  $32.88 \pm 0.74$  g ağırlığa ulaşmıştır. Deneyler  $25 \pm 1$  °C'de yürütülmüş, günde sekiz saat aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Merkezi havalandırma sistemiyle akvaryumların havalandırılması sağlanmıştır. Laboratuvar koşullarına uyumları sırasında balıklar, hazır balık yemi kullanılarak (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Denemelerden 48 saat öncesinde yem kesilmiş ve denemeler boyunca günde iki defa olmak üzere vücut ağırlıklarının %2'si kadar yem ile balıklar beslenmiştir. Deney suyunun kimyasal özellikleri; çözülmüş oksijen  $7.33 \pm 0.32$  mg/L, toplam sertlik  $321 \pm 3.5$  ppm CaCO<sub>3</sub> ve pH  $8.11 \pm 0.06$  olarak ölçülmüştür.

Deneylerde thiamethoxamın ticari formülasyonu olan Actara 240 SC (Syngenta) kullanılmıştır. Deneyler her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan 3 adet cam akvaryumda yürütülmüştür. Balıklar thiamethoxamın 60 ve 120 mg/L derişimlerinin etkisine 4 ve 14 gün sürelerle bırakılmıştır. *O. niloticus* için thiametoxamın LC<sub>50</sub> değeri 322.08 mg/L olarak saptanmıştır [12]. Çalışmamızda test edilen thiametoxamın 60 ve 120 mg/L derişimleri, bu LC<sub>50</sub> değeri dikkate alınarak subletal konsantrasyonlar olarak seçilmiştir. Deneylerde 3 akvaryumun ilk ikisine 120 L farklı thiamethoxam çözeltileri (60 ve 120 mg/L); üçüncü akvaryuma ise kontrol grubu olarak kullanılarak içerisinde aynı hacimde (120 L) dinlendirilmiş çeşme suyu konmuştur. Deney akvaryumlarında kullanılan pestisit çözeltilerinin derişimlerinde zamana bağlı olarak değişim olabileceği dikkate alınarak çözeltiler her gün yeni hazırlanan stok çözeltilerden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir. Deneyler altı tekrarlı olarak yürütülerek her tekrarda bir balık kullanılmıştır.

Belirlenen her sürenin sonunda deney akvaryumlarından rastgele seçilen balıklar, çeşme suyuyla yıkanarak temizlenmiş, yüzeylerinde bulunan su damlacıkları kurutma kağıdıyla alınmış ve boy ve ağırlıkları saptanarak diseksiyona hazır hale getirilmiştir. Balıklar diseksiyondan önce spinal yapılarak öldürülmüştür. Steril aletlerle solungaç ve bağırsak doku örnekleri buz üzerinde disekte edilmiş, bu örnekler % 0.59 NaCl ile yıkanmış ve ağırlıkları alındıktan sonra biyokimyasal analize kadar -80 °C'de muhafaza edilmişlerdir. Disekte edilen dokular 1/10 ağırlık/hacim (w/v) olacak şekilde 0.25 M süzkroz içeren 0.05 M soğutulmuş Na-P tamponu (pH: 7.4) ile buz içerisinde ultra-turrax

homojenizatörde 3 dakika süreyle 10.000 rpm'de homojenize edilmiştir. Homojenatlar +4 °C'de 10.000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda CAT ve SOD aktiviteleri ile GSH, MDA ve protein düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmiştir. CAT aktivitesi [13]; SOD aktivitesi [14]; GSH düzeyi [15]; MDA düzeyi [16], ve total protein miktarı ise [17] önerdiği yöntemlere göre belirlenmiştir.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 21.0 paket programı kullanılarak One Way-ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi)-Duncan Testi ve Student-*t* Test (Independent-Sample *t* Test) kullanılarak yapılmıştır.

### 3. Bulgular ve tartışma

Balıklar su kirliliğine karşı oldukça duyarlı canlılardır. Yaşadıkları ortamlarda pestisitleri de içeren birçok farklı kirleticilerin toksik etkilerine yaşam döngülerinin hemen her anında maruz kalabilmektedirler. Pestisitler balıkların birçok organ ve yapılarındaki temel fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkileyerek yaşamlarını bile sonlandırabilecek etkilere neden olabilmektedirler. Bu canlıların özellikle karaciğer, solungaç ve bağırsak gibi dokuları kirleticilerin biyotransformasyonu, detoksifikasyonu ya da depolanması gibi süreçlerde önemli roller oynamaktadır. Sunulan çalışmada 120 mg/L thiamethoxam etkisinde ve deneylerin sona erdirildiği 14 günlük süre sonunda *O. niloticus*'ta mortalite saptanmamıştır. Bununla birlikte bu insektisit antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH ve MDA düzeylerinde değişimlere neden olarak subletal etkiler göstermiştir. Thiamethoxam etkisinde çalışılan balıklarda ölüm gözlenmemesinin, bu canlılardaki güçlü bir detoksifikasyon ve savunma mekanizmasının varlığıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde thiamethoxamın 150 mg/L etkisine 14 gün süreyle bırakılan *O. niloticus*'ta [18] mortalite gözlenmemiştir.

Thiamethoxam etkileşimine yanıtta *O. niloticus*'ta incelenen oksidatif stres parametrelerinde dokuya, ortam derişimi ve etki süresine bağlı olarak önemli değişimlerin meydana geldiği belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarımızla benzer olarak daha önceki çalışmalarda da balıkların dokularındaki antioksidan savunma sistemlerinde meydana gelen değişimlerin çalışılan pestisitlere ve bu kimyasalların etki süreleri ile ortam derişimlerine bağlı olarak oluştuğu rapor edilmiştir [19, 20].

#### 3.1. CAT aktivitesi

Belirli bir ortam derişiminde ve etki süresinde *O. niloticus*'un dokularındaki CAT enzim aktivitesi üzerine thiamethoxamın etkileri Tablo 1'de verilmiştir. Thiamethoxamın etkisinde özellikle de yüksek ortam derişiminde CAT aktivitesinde solungaç ve bağırsak dokularında 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış; 14 günlük süre sonunda ise solungaç dokusunda anlamlı bir azalış belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). 120 mg/L thiamethoxamın etkisinde CAT aktivitesinde, 4 günlük süre sonunda solungaçta %47, bağırsakta ise %59 düzeyinde bir artış; 14 günlük etki süresi sonunda solungaç dokusunda %29 düzeyinde bir azalış saptanmıştır.

Tablo 1. *O. niloticus*'ta dokuların CAT aktivitesi (U/mg protein) üzerine thiamethoxamın etkisi.

Derişim	Solungaç		Bağırsak	
	4 Gün	14 Gün	4 Gün	14 Gün
Kontrol	151±3.11 <b>ax</b>	148±2.28 <b>ax</b>	86±3.21 <b>ax</b>	80±4.18 <b>ax</b>
60 mg/L	162±2.43 <b>ax</b>	111±4.63 <b>by</b>	129±3.17 <b>bx</b>	91±4.65 <b>ay</b>
120 mg/L	222±4.05 <b>bx</b>	105±2.31 <b>by</b>	137±2.40 <b>bx</b>	88±3.71 <b>ay</b>

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. Enzim aktivitesinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a ve b harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir (P<0.05)

Sunulan çalışmada CAT aktivitesindeki artışların H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı hücrel bir yanıt olarak oluştuğu buna karşın süreye bağlı olarak CAT aktivitesinde gözlenen azalışların ise enzim aktivitesini inhibe ettiği belirlenen süperoksit anyon radikalının [21] thiamethoxam etkisinde artan üretimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hücreler CAT aktivitesindeki artışla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin potansiyel toksik etkilerine karşı korunabilirken tam tersi durumda azalan aktiviteye bağlı olarak daha savunmasız duruma düşebilmektedirler. Çalışmamızla benzer olarak thiamethoxam etkisine farklı sürelerle bırakılan *Danio rerio*'da oksidatif stres yanıtlarının incelendiği araştırmada CAT aktivitesi 7 ve 14 günlük süreler sonunda artmış; 21 ve 28 günlük süreler sonunda ise azalmıştır [22]. Araştırmacılar başlangıçta artan CAT aktivitesinin oksidatif strese bir yanıt olarak; ancak, süreye bağlı olarak gözlenen bu enzim aktivitesinde azalışların ise aşırı düzeylerde artan ROT oluşumu sonucunda meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

### 3.2. SOD aktivitesi

Sunulan araştırmada *O. niloticus*'ta diğer önemli bir antioksidan enzim olan SOD aktivitesinde thiametoxam etkisinde solungaç dokusunda hem 4 hem de 14 günlük süreler sonunda her iki ortam derişiminde; bağırsak dokusunda ise 14 günlük süre sonunda ve yüksek derişimin etkisinde anlamlı bir artış belirlenmiştir (Tablo 2, P<0.05). Thiametoxamın yüksek ortam derişimlerinin etkisinde SOD aktivitesinde 14 günlük süre sonunda solungaç ve bağırsak dokularında sırasıyla %99 ve %38 düzeylerinde artışlar belirlenmiştir.

Tablo 2. *O. niloticus*'ta dokuların SOD aktivitesi (U/mg protein) üzerine thiamethoxamın etkisi.

Derişim	Solungaç		Bağırsak	
	4 Gün	14 Gün	4 Gün	14 Gün
Kontrol	20.14±0.23 <b>ax</b>	18.33±0.69 <b>ax</b>	29.40±0.42 <b>ax</b>	28.26±0.28 <b>ax</b>
60 mg/L	34.49±0.53 <b>bx</b>	27.04±0.39 <b>by</b>	31.84±0.69 <b>ax</b>	29.69±0.51 <b>ax</b>
120 mg/L	45.86±0.78 <b>cx</b>	36.41±0.43 <b>cy</b>	31.56±0.77 <b>ax</b>	38.97±0.32 <b>by</b>

Veriler Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata şeklinde verilmiştir. Enzim aktivitesinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ( $P<0.05$ )

İnsektisit etkisinde SOD enzim aktivitesinde gözlenen artışların thiamethoxam etkisinde artan süperoksit anyon radikaline karşı bir savunma yanıtı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Bu şekildeki bir yanıt hem süperoksitin doğrudan hem de bir takım reaksiyonlar sonucunda hidroksil radikaline dönüşümüne bağlı olarak dolaylı yoldan hücrede oluşturacağı zararlı etkilerine karşı hücresel yapı ve bileşenlerin korumasında önemli olabileceği öngörülmektedir. Çalışma sonuçlarımızla uyumlu olarak 0.30, 1.25 ve 5.00 mg/L thiamethoxam etkisine dört hafta süreyle bırakılan *D. rerio*'da SOD aktivitesinin 7 ve 14 günlük süreler sonunda anlamlı olacak şekilde arttığı saptanmıştır [22]. Araştırmacılar SOD enzim aktivitesinin thiamethoxamın etkisinde balıklarda artan süperoksit radikal üretimine bağlı olarak hücreleri bu radikal etkilerinden korumak için arttığını rapor etmişlerdir. Antioksidan enzim aktivitesindeki artışların balıklarda kirleticilere karşı bir adaptasyon yanıtı olarak oluştuğu ve kirleticilerin etkisinde oluşan ROT'ların nötralize edilmesinde önemli olduğu belirtilmektedir [23].

### 3.3. GSH düzeyi

Sunulan çalışmada *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokuları GSH düzeylerinde özellikle de thiametoxamın yüksek ortam derişiminin etkisinde 4 günlük süre sonunda anlamlı bir artış; 14 günlük süre sonunda ise anlamlı bir azalış olduğu saptanmıştır (Tablo 3,  $P<0.05$ ). 120 mg/L thiametoxam etkisinde GSH düzeyi solungaç ve bağırsakta 4 günlük süre sonunda sırasıyla %30 ve %26 düzeyinde bir artış; 14 günlük süre sonunda ise sırasıyla %23 ve %41 düzeyinde bir azalış göstermiştir.

Tablo 3. *O. niloticus*'ta dokuların GSH düzeyi ( $\mu\text{mol/g}$  protein) üzerine thiamethoxamın etkisi.

Derişim	Solungaç		Bağırsak	
	4 Gün	14 Gün	4 Gün	14 Gün
Kontrol	2.10 $\pm$ 0.03 <b>ax</b>	2.07 $\pm$ 0.05 <b>ax</b>	1.72 $\pm$ 0.04 <b>ax</b>	1.76 $\pm$ 0.05 <b>ax</b>
60 mg/L	2.58 $\pm$ 0.05 <b>bx</b>	2.05 $\pm$ 0.04 <b>ay</b>	1.77 $\pm$ 0.03 <b>ax</b>	1.34 $\pm$ 0.02 <b>by</b>
120 mg/L	2.73 $\pm$ 0.04 <b>bx</b>	1.59 $\pm$ 0.02 <b>by</b>	2.16 $\pm$ 0.05 <b>bx</b>	1.04 $\pm$ 0.04 <b>cy</b>

Veriler Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata şeklinde verilmiştir. GSH düzeyinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ( $P<0.05$ )

*O. niloticus*'ta GSH düzeylerindeki artışların thiametoxamın etkisine bir adaptasyon yanıtı olarak; bununla birlikte, azalan GSH düzeylerinin ise süreye bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin bir sonucu olarak oluştuğu öngörülmektedir. Araştırma sonuçlarımıza benzer olacak şekilde chlorpyrifosun etkisinde *O. niloticus*'un karaciğer dokusunda 48 saatlik süre sonunda artan GSH düzeylerinin 96 saatlik süre sonunda azaldığı rapor edilmiştir [20]. Araştırmacı GSH düzeylerindeki artışların insektisite karşı bir adaptif yanıt olarak ve azalışların ise artan oksidatif stres sonucunda meydana geldiğini belirtmiştir. Genel olarak düşük düzeydeki oksidatif stresin GSH düzeylerinde

artışa; bununla birlikte, şiddetli bir oksidatif stres durumunda ise GSH'nin oksidasyonuna bağlı olarak bu tripeptidin düzeylerinde anlamlı azalışlara neden olabileceği rapor edilmiştir [24]. Başka bir çalışmada da 2,4-diklorfenol etkisine 40 gün süreyle bırakılan *Carassius auratus*'ta karaciğer GSH düzeylerinde önemli artışların meydana geldiği ve bu artışların da kirleticilerin etkisinde ortaya çıkan oksidatif strese karşı adaptif ve koruyucu bir rolü gösterdiği rapor edilmiştir [25].

### 3.4. MDA düzeyi

Bu çalışmada *O. niloticus*'un solungaç ve bağırsak dokuları MDA düzeyinin thiametoxamin özellikle de yüksek ortam derişiminde 14 günlük süre sonunda önemli düzeylerde arttığı belirlenmiştir (Tablo 4,  $P<0.05$ ). Son etkileşim süresi sonunda MDA düzeyinde 120 mg/L thiametoxamin etkisinde solungaç ve bağırsak dokularında sırasıyla %70 ve %42 düzeylerinde artışlar saptanmıştır.

Tablo 4. *O. niloticus*'ta dokuların MDA düzeyi (nmol/mg protein) üzerine thiametoxaminin etkisi.

Derişim	Solungaç		Bağırsak	
	4 Gün	14 Gün	4 Gün	14 Gün
Kontrol	1.08±0.03 <b>ax</b>	1.05±0.05 <b>ax</b>	0.81±0.02 <b>ax</b>	0.84±0.04 <b>ax</b>
60 mg/L	1.09±0.04 <b>ax</b>	1.33±0.05 <b>by</b>	0.79±0.05 <b>ax</b>	0.87±0.03 <b>ax</b>
120 mg/L	1.11±0.03 <b>ax</b>	1.78±0.06 <b>cy</b>	0.82±0.03 <b>ax</b>	1.19±0.04 <b>by</b>

Veriler Aritmetik ortalama ± Standart hata şeklinde verilmiştir. MDA düzeyinde aynı etkileşim süresinde derişimler arasındaki ayrımı göstermek için a, b ve c harfleri; belirli bir ortam derişiminde süreler arasındaki ayrımı göstermek için ise x ve y harfleri kullanılmıştır. Farklı harfler veriler arasındaki istatistiksel ayrım olduğunu göstermektedir ( $P<0.05$ )

Pestisitlerin moleküler düzeydeki en önemli toksik etkilerinden biri lipid peroksidasyonuna yol açmalarıdır. Toksikantların etkisinde meydana gelen lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden olan MDA hücre zarlarının stabil yapısının hasar gördüğünü gösteren önemli bir indikatördür. Lipid peroksidasyonu hücre zarlarının yapısının bozulmasına, zarların seçici geçirgenlik özelliklerini kaybolmasına yol açarak hücreleri ölüme kadar götürecek süreçlerin oluşmasına neden olan ciddi bir durumdur [11].

Sunulan çalışmada *O. niloticus*'ta MDA düzeyleri thiametoxaminin toksik etkilerinin bir sonucu olarak artmış olabilir. Bu insektisit etkisinde solungaç ve bağırsak dokularında oluşan oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen lipid peroksidasyonunun MDA düzeylerindeki artışın esas nedeni olduğu düşünülmektedir. Başka bir çalışmada da benzer şekilde deltamethrin etkisine bırakılan *Cyprinus carpio*'da dokulardaki MDA düzeylerinde önemli artışlar belirlenmiştir [9]. Araştırmacılar MDA düzeyindeki artışların insektisit etkisinde oluşan aşırı ROT üretimine bağlı olarak meydana gelen lipid peroksidasyonu sonucunda oluştuğunu belirtmişlerdir.

MDA düzeyi, antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğini ve oksidatif stres durumlarını değerlendirmede oldukça yararlı bir parametre olarak kullanılmaktadır. Araştırmamızda *O. niloticus*'ta süreye bağlı olarak artan MDA düzeyleri solungaç ve



bağırsak dokularındaki antioksidan savunma mekanizmalarındaki bir yetersizliği ve belirgin bir oksidatif stresi gösterdiği öngörülmektedir. Çalışmamızda thiamethoxamın etkisinde özellikle de 14 günlük süre sonunda azalan CAT aktivitesi ve GSH düzeyleri ile artan MDA düzeylerinin ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu antioksidan parametrelerdeki azalış hücreleri oksidatif stresin olumsuz etkisine açık hale getirmiş ve bunun sonucunda da artan lipid peroksidasyonu ile MDA düzeyleri artmış olabilir. Sonuçlarımızla paralel olarak başka bir çalışmada da neonikotinoid insektisit türü olan nitenpyramın etkisinde *D. rerio*'da süreye bağlı olarak azalan CAT ve SOD aktivitesine bağlı olarak artan ROT üretimi sonucunda meydana gelen lipid peroksidasyonu ile MDA düzeylerinde önemli artışların olduğu rapor edilmiştir [19].

#### 4. Sonuç

Sunulan çalışmada *O. niloticus*'un dokularındaki oksidatif stres parametrelerinin thiamethoxamdan olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Sunulan araştırmada thiamethoxam etkisinde süreye bağlı olarak azalan CAT aktivitesi ve GSH düzeyleri ile artan MDA düzeyleri *O. niloticus*'ta belirgin bir oksidatif stres durumunun ortaya çıktığını göstermektedir. Çalışmamız thiamethoxamın hedef olmayan organizmalar üzerinde önemli toksik etkilere neden olabilecek bir insektisit olarak dikkate alınması gerektiğini de göstermektedir. Son olarak araştırmamızda thiamethoxamın balıklar için toksik olduğu ve incelenen oksidatif stres parametrelerinin bu insektisit etkilerinin değerlendirilmesinde yararlı biyobelirteçler olabileceği de vurgulanabilir.

#### Teşekkür

Bu çalışma FEFYL/2015-0008 nolu Adıyaman Üniversitesi (ADYÜ) Bilimsel Araştırma Projesi ile yürütülmüş olup ADYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminin değerli yöneticilerine ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- [1] Kovganko, N.V. ve Kashkan ZhN., Advances in the synthesis of neonicotinoids, **Russian Journal of Organic Chemistry**, 40(12), 1709-1726, (2004).
- [2] Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. ve Elbert, A., Overview of the status and global strategy for neonicotinoids, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 2897–2908, (2011).
- [3] Casida, J.E. ve Durkin, K.A., Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects, **Annual Review of Entomology**, 58, 99–117, (2013).
- [4] Thany, S.H., Neonicotinoid insecticides: Historical evolution and resistance mechanisms, **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 683, 75–83, (2010).
- [5] Karmakar, R. ve Kulshrestha, G., Persistence, metabolism and safety evaluation of thiamethoxam in tomato crop, **Pest Management Science**, 65, 931–937, (2009).

- [6] Laycock, I., Cotterell, K.C., O’Shea-Wheller, T.A. ve Cresswell, J.E., Effects of the neonicotinoid pesticide thiamethoxam at field-realistic levels on microcolonies of *Bombus terrestris* worker bumble bees, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 100, 153–158, (2014).
- [7] European Commission., Europa press release—Bees & pesticides: Commission to proceed with plan to better protect bees, (2013). [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-13-379\\_en.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-13-379_en.htm), (11, 2014).
- [8] Maienfisch, P., Angst, M., Brandl, F., Fischer, W., Hofer, D., Kayser, H., Kobel, W., Rindlisbacher, A., Senn, R., Steinemann, A. ve Widmer, H., Chemistry and biology of thiamethoxam: a second generation neonicotinoid, **Pest Management Science**, 57, 906-913, (2001).
- [9] Yonar, M.E. ve Sakin, F., Ameliorative effect of lycopene on antioxidant status in *Cyprinus carpio* during pyrethroid deltamethrin exposure, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 99, 226–231, (2011).
- [10] Zirong, X. ve Shijun, B., Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 67, 89–94, (2007).
- [11] Toroser, D., Orr, W.C. ve Sohal, R.S., Carbonylation of mitochondrial proteins in *Drosophila melanogaster* during aging, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 363, 418–424, (2007).
- [12] Albinati, A.C.L., Albinati, R.C.B., Lira, A.D. ve Soares, P.C., Acute toxicity and ecotoxicological risk of thiamethoxam insecticide in Nile tilapia fingerlings, **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, 68, 1343-1350, (2016).
- [13] Lartillot, S., Kadziora, P. ve Athios, A., Purification and characterization of new fungal catalase, **Preparative Biochemistry**, 18(3), 241-246, (1988).
- [14] Sun, Y., Oberley, L.W. ve Li, Y., A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, **Clinical Chemistry**, 34, 497-500, (1988).
- [15] Beutler, E., **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods** 2nd. ed., Grune and Stratton Company, New York, (1975).
- [16] Dubovskiy, I.M., Martemyanov, V.V., Vorontsova, Y.L., Rantala, M.J., Gryzanova, E.V. ve Glupov, V.V., Effect of bacterial infection on antioxidant activity and lipid peroxidation in the midgut of *Galleria mellonella* L. larvae (Lepidoptera, Pyralidae), **Comparative Biochemistry and Physiology**, 148, 1–5, (2008).
- [17] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., Protein measurements with the folin phenol reagent, **Journal of Biological Chemistry**, 193, 265-275, (1951).
- [18] Bose, S., Nath, S. ve Sahana, S.S., Toxic impact of thiamethoxam on the growth performance and liver protein concentration of a freshwater fish *Oreochromis niloticus* (Trewavas), **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Science**, 1(4), 274-280, (2011).
- [19] Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M. ve Wang, J., Toxic effects of nitenpyram on antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 122, 54–60, (2015).
- [20] Tutuş, R., *Oreochromis niloticus*’un karaciğer dokusundaki antioksidan sistemler ve lipid peroksidasyonu üzerine chlorpyrifos, emamectin benzoate ve abamectin türü pestisitlerin etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adıyaman, (2016).

- [21] Ballesteros, M.L., Wunderlin, D.A. ve Bistoni, M.A., Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72, 199–205, (2009).
- [22] Yan, S.H., Wang, J.H., Zhu, L.S., Chen, A.M. ve Wang, J., Thiamethoxam induces oxidative stress and antioxidant response in zebrafish (*Danio rerio*) Livers, **Environmental Toxicology**, 3, 2006-2015, (2016).
- [23] Kavitha, P. ve Venkateswara Rao, J., Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 87, 182–188, (2007).
- [24] Elia, A.C., Galarini, R., Dorr, A.J.M. ve Taticchi, M.I., Bioaccumulation of heavy metals, organochlorine pesticides, and detoxication biochemical indexes in tissues of *Ictalurus melas* of lake Trasimeno, **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 76, 132–139, (2006).
- [25] Zhang, J.F., Shen, H., Wang, X.R., Wu, J.C. ve Xue, Y.Q., Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*, **Chemosphere**, 55, 167–174, (2004).