

**NEVŞEHİR – KAPADOKYA BÖLGESİ'NDE KARA  
KAPLUMBAĞALARINDAKİ (*TESTUDO GRAECA*,  
LINNAEUS 1758) BAZI ENZİM VE HORMON  
DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION ON SOME ENZYME AND HORMONE  
LEVELS OF THE COMMON TORTOISES (*TESTUDO  
GRAECA*, LINNAEUS 1758) IN NEVSEHIR –  
CAPPADOCIA REGION**

**MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN**

**Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA**

**Tez Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

olarak hazırlanmıştır.

2014

**MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN'in** hazırladığı “**NEVŞEHİR – KAPADOKYA BÖLGESİ'NDE KARA KAPLUMBAĞALARINDAKİ (TESTUDO GRAECA, LINNAEUS,1758) BAZI ENZİM VE HORMON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

(Prof. Dr. Murat ÖZMEN)

Danışman

(Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA)

Üye

(Prof. Dr. Nurhayat BARLAS)

Üye

(Doç.Dr. Zafer AYAŞ)

Üye

(Yrd. Doç. Dr. Belda ERKMEN)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

17 /01 /2014

MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN



## ÖZET

### NEVŞEHİR – KAPADOKYA BÖLGESİ'NDE KARA KAPLUMBAĞALARINDAKİ (*TESTUDO GRAECA*, LINNAEUS 1758) BAZI ENZİM VE HORMON DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA

Eş Danışman: Prof.Dr. JUAN CARLOS SANCHEZ-HERNANDEZ

OCAK 2014, 117 sayfa

Bu çalışma, 2012 yılı Nisan – Ekim döneminde, Kapadokya Bölgesinde (Nevşehir) bulunan Kaplumbağa ve Nar Vadilerindeki kara kaplumbağalarından (*Testudo graeca*), alınan kan örneklerindeki (Kaplumbağa Vadisi'nden 55 örnek, Nar Vadisi: 34) bazı enzim ve hormon düzeyleri araştırılmıştır. Bu kapsamda, esteraz enzimlerinin (kolinesteraz: BChE ve karboksilesteraz: CbE) aktivite ve substrat etkileşimleri, glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ile eşey hormonları testosteron ve 17-β Estradiol düzeyi incelenmiştir. Her iki alanın kara kaplumbağaları kan örneklerine ait değerler alansal ve zamansal yönden karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular ile BChE enzim aktivitesi hem asetiltiyokolin iyodid hem de bütiriltiyokolin iyodid substratları ile etkileşimi Kaplumbağa Vadisinden kan örneklerinde 516,56-411,26 nmol/dk/ml serum, Nar Vadisinde ise 333,86-180,94 nmol/dk/ml serum olarak ölçülmüştür ve en yüksek enzim değerleri Haziran ayında alınan kan örneklerinde tespit edilmiştir. CbE aktivitesi ise 4 farklı substrat [1-Naftilasetat (1-NA), 1-Naftilbütirat (1-NB), 4 Nitrofenilasetat (4-NPA), 4-Nitrofenilbütirat (4-NPB)] ile değerlendirilmiş ve alan etkisini saptamada en başarılı olanı 1-NA bulunmuştur. Bu bulgular esterazların *in vitro* inhibisyonunu gösteren laboratuvar çalışmaları ile de desteklenmiştir. Nar Vadisinden alınan kan örneklerinde GST aktivitesindeki istatistiksel olarak en anlamlı artış Temmuz ayında (0,203; KV: 0,100 µmol/dk/ml serum) saptanmış olup, bu durum Temmuz ayında alandaki

pestisit kullanımını ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan eşey hormon verileri, her iki alandan elde edilerek bir arada değerlendirildiğinde hem testosteron hem de 17- $\beta$  Estradiol'ün miktarında aylara göre dalgalanma gösterdiği saptanmıştır. Polikloterm canlılar olan kara kaplumbağalarında bu sonuçlar üreme fenolojisi ve meteorolojik veriler ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak enzim aktivitelerindeki alansal farklılığa pestisit kullanımını başta olmak üzere kene varlığı gibi birçok etkenin neden olabileceği değerlendirilmiştir. Zira Nar Vadisi tarımsal faaliyetlerin yoğun yürütüldüğü bir alan iken, Kaplumbağa vadisi görece daha temiz ve mera amaçlı kullanılan bir vadidir. Elde edilen veriler, çevre kirleticilerin yabanıl hayvan türleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde, bu çalışmada ele alınan enzim ve hormonların “biyobelirteçler”, kara kaplumbağalarının ise uygun “biyomonitör organizma” olabileceği fikrini vermektedir.

**Anahtar kelimeler:** Nar ve Kaplumbağa vadisi, *Testudo graeca*, organik fosfatlı insektisitler, kene, kolinesteraz, karboksilesteraz, Glutasyon S-transferaz, Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon Redüktaz, Testosteron, E<sub>2</sub>, *in vitro* inhibisyon.

## ABSTRACT

### INVESTIGATION ON SOME ENZYME AND HORMONE LEVELS OF THE COMMON TORTOISES (*TESTUDO GRAECA* LINNAEUS, 1758) IN NEVSEHIR – CAPPADOCIA REGION

MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. DÜRDANE KOLANKAYA

Cosupervisor: Prof. Dr. JUAN CARLOS SANCHEZ-HERHANDEZ

JANUARY 2014, 117 pages

This study was on common tortoise (*Testudo graeca*) (55 tortoises from Kaplumbaga valley and 34 tortoises from Nar valley) between April to October 2012 in Nevsehir, Cappadocia Region. The enzyme and hormone levels are investigated by taking the blood samples. Enzymes, esterase (cholinesterases (BChE) & carboxylesterases (CbE)) and glutathione enzymes (glutathione S transferases (GST), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx)) and sex steroid hormones (Testosterone and Estradiol) are considered as parameters. The tortoise blood samples were compared in two areas by seasonal fluctuation. BChE enzyme activities were significantly higher in Kaplumbaga valley (516,56 & 411,26 nmol/min/ml serum) than Nar Valley (333,86 & 180,94 nmol/min/ml serum) in June 2012 with both acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide substrates. CbE activities were tested by 4 different substrates 1-Naphthylacetate:1-NA, 1-Naptylbutyrate:1-NB, 4-Nitrophenylacetate :4-NPA, 4-Nitrophenylbutyrate:4-NPB. 1-NA is the most successful substrate to reflect the area effect. These findings were also supported by esterases' *in vitro* inhibition studies. Beside this result, it has been shown that GST is the most



statistically effective one among these oxidative stress enzymes. The enzyme activity increased in Nar Valley to reflect the pesticide contamination response (GST NV: 0,203  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  serum; KV: 0,100  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  serum). On the other hand, when the sex hormone levels were considered together for both testosterone and 17- $\beta$  Estradiol from both sites, they showed a significant month by month fluctuations. This result is compatible with reproduction phenology and meteorological datas in common tortoises which are poikilothermic animals. In conclusion, the areal difference between enzyme activity results can be affected by several environmental factors, especially pesticide use, tick presence. While Nar valley is an area where is known for agricultural activity, Kaplumbaga valley is relatively a reference area where is known for rangeland use. In this respect, it's suggested that the evaluated enzyme and hormone parameters can be considered as biomarkers and the common tortoise can be a biomonitor organism in monitoring environmental contaminants effects on wild animals.

**Keywords:** Nar and Kaplumbaga Valley, *Testudo graeca*, organophosphate insecticides, cholinesterases, carboxylesterases, glutathione S-transferases, glutathione peroxidase, glutathione reductase, testosterone, 17- $\beta$  estradiol, *in vitro* inhibition.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışma süresince bilgi ve önerileriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA ' ya,  
Tez hazırlık aşamasında önce fikirleri ile ufkumu, sonrasında da laboratuvarını açarak, sunduğu imkanlar ile beni cesaretlendiren eşdanışman hocam Sayın Prof. Dr. Juan Carlos SANCHEZ-HERNANDEZ ' e,  
Elde ettiğimiz sonuçların istatistiksel değerlendirmesinde yardımına koşan Sayın Doç.Dr. Çağatay TAVŞANOĞLU ' na,  
Adına lisanüstü eğitim-öğretim gördüğüm Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Biyoloji Bölümü' ne ve bu bağlamda desteklerini aldığım H.Ü. ÖYP Koordinatörlüğü ' ne,  
Saha çalışmalarında bana desteğini esirgemeyen başta Dr. Gönül ARSLAN olmak üzere özel çalışma öğrencileri Can ELVERİCİ, Alican ÖZTABAK, Kübra ŞEKER, Bahar ÖZSOY ve Bengisu SUBAŞI ' na,  
Laboratuvar çalışmalarında gösterdikleri üstün sabırla analiz işlemlerinde yardımlarını gördüğüm başta Eylül TURASAN ve Salomé MARTINEZ olmak üzere özel çalışma öğrencileri Aysu ÖZKAN, Cansu AKSOY, Nihal ÖZDEMİR ' e,  
Lisans eğitimimden bu yana akademik hayata beni teşvik eden ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta oda arkadaşım Araş.Gör. Gözde KARABULUT olmak üzere tüm Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Yardımcılarına,  
Tez çalışmam süresince gerek bilimsel gerekse de insani katkıları ile yanımda olan Araş.Gör. Fatma ZİLİFDAR, Egemen FOTO, Derya KALELİOĞLU ile merhum Taner YALÇIN ve Araş.Gör. Ömer ORKUN ' a,  
Herşeyin olumsuz gittiğini düşündüğüm günlerde desteğini gördüğüm değerli meslektaşım Araş. Gör. Gülcan KUYUCUKLU ' ya,  
Herşeyden ve herkesten önemli olarak, yaşamları boyunca attığım her adımda olduğu gibi bu tez çalışmasında da büyük bir özveri ile koşulsuz biçimde beni destekleyen ve yüreklendiren çok kıymetli annem, babam ve kardeşlerim ile nişanlım Esra ÇOŞKUN ' a, en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mehmet Kürşat ŞAHİN

Ankara, Ocak 2014

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
TABLolar DİZİNİ .....	xvi
1.GİRİŞ .....	1
1.1. <i>Testudo graeca</i> ya ilişkin Genel Bilgiler .....	6
1.1.1. <i>Testudo graeca</i> 'nın populasyon biyolojisi .....	6
1.1.2. <i>Testudo graeca</i> 'nın aktivite biyolojisi .....	8
1.1.3. <i>Testudo graeca</i> 'nın üreme biyolojisi.....	8
1.2. Ekotoksikoloji ve Kaplumbağa .....	11
1.2.1. Kısaca ekotoksikoloji.....	11
1.2.2 Kara kaplumbağası ve sürüngenlerin durumu .....	12
1.2.3. Bazı çevresel kirletici tipleri .....	19
1.2.3.1. Sentetik Piretiroit İnsektisitler .....	19
1.2.3.2. Organik fosfatlı ve Karbamat İnsektisitler .....	20

1.2.3.2.1. Organik fosfatlılar .....	20
1.2.3.2.2. Karbamatlar .....	21
1.2.4. Değerlendirilen Biyobelirteçler: Enzimler, hormonlar .....	22
1.2.4.1. Enzimler .....	22
1.2.4.1.1. "B" esterazlar .....	22
1.2.4.1.1.1. Kolinesterazlar .....	23
1.2.4.1.1.2. Karboksilesterazlar .....	25
1.2.4.1.2. Oksidatif Stres Enzimleri .....	26
1.2.4.1.2.1. Glutasyon S-transferaz .....	28
1.2.4.1.2.2. Glutasyon Peroksidaz .....	29
1.2.4.1.2.3. Glutasyon Redüktaz .....	30
1.2.4.2. Hormonlar .....	30
1.2.4.2.1. Testosteron .....	30
1.2.4.2.2. Estradiol .....	32
2. MATERYAL VE METOT .....	33
2.1. Çalışma alanları .....	33
2.1.1. Aktivite dönemlerinin değerlendirilmesi .....	37
2.1.2. Üreme dönemlerinin değerlendirilmesi .....	41
2.1.3. Tarımsal alanda varlığı bilinen kimyasallar ve zamana göre kullanımları .....	41
2.2. Laboratuvar çalışmaları .....	43
2.2.1. Sahada hayvandan kan örneklerinin alınması .....	43

2.2.2. Serum ve Plazma olarak örneklerin ayrıştırılması .....	44
2.2.2.1. Serum örnekleri ile incelenen enzimler .....	44
2.2.2.1.1. Kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi .....	44
2.2.2.1.2. Karboksilesteraz aktivitesinin ölçülmesi .....	45
2.2.2.1.2.1. <i>in vitro</i> kolinesteraz aktivite ölçümü .....	47
2.2.2.1.3. Oksidatif stres enzimlerinin ölçülmesi.....	48
2.2.2.1.3.1. Glutasyon – S – Transferaz enziminin ölçülmesi .....	48
2.2.2.1.3.2. Glutasyon Peroksidaz enziminin ölçülmesi .....	48
2.2.2.1.3.3. Glutasyon Redüktaz enziminin ölçülmesi .....	49
2.2.2.2. Plazmada hormonların analizi .....	49
2.2.2.2.1. Testosteron seviyesinin ölçülmesi .....	49
2.2.2.2.2. Estradiol seviyesinin ölçülmesi .....	51
2.2.3. İstatistiksel Analizler .....	51
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA .....	53
3.1. Saha Sonuçları .....	53
3.1.1. Populasyon çalışmaları .....	53
3.1.2. Aktivite zamanı çalışmaları .....	56
3.1.3. Üreme dönemi çalışmaları .....	62
3.2. Laboratuvar Sonuçları .....	65
3.2.1. Serum örnekleri ile incelenen enzim aktiviteleri .....	65
3.2.1.1. Kolinesteraz enzim aktivitesi sonuçları.....	65

3.2.1.2. Karboksilesteraz enzim aktivitesi sonuçları .....	72
3.2.1.3. Oksidatif stres enzim enzim aktivitesi sonuçları .....	84
3.2.1.3.1. Glutasyon – S – Transferaz enzim aktivitesi sonuçları .....	85
3.2.1.3.2. Glutasyon Redüktaz enzim aktivitesi sonuçları .....	90
3.2.1.3.3. Glutasyon Peroksidaz enzim aktivitesi sonuçları .....	93
3.2.2. Plazma örnekleri ile ölçümü yapılan eşey hormonları .....	97
KAYNAKLAR .....	100
ÖZGEÇMİŞ .....	117

## SİMGELER VE KISALTMALAR

°C: Santigrad Derece

µl: mikrolitre

µmol: mikromol

4 – NPA: 4-Nitrofenil Asetat

4 – NPB: 4-Nitrofenil Bütirat

AChE: Asetilkolinesteraz

AcSCh: Asetiltiyokolin iyodid

BChE: Bütirilkolinesteraz

BuSCh: Bütiriltiyokolin iyodid

CB: Karbamat

CbE: Karboksilesteraz

DDE: Diklorodifeniltrikloroetilen

DDT: Diklorodifeniltrikloroetan

DKB: Düz Karapas Boyu

DTNB: NitroBenzoik Asit

E<sub>2</sub>: 17-beta (β) estradiol

EKB: Eğri Karapas Boyu

EPA: Çevre Koruma Ajansı

g: gram

GPx: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Glutasyon

GSSG: Glutasyon disülfid

GST: Glutasyon S-transferaz

ha: hektar

IUCN: Dünya Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği

iso – OMPA: tetraizopropil pirofosforamit

kg: kilogram

km: kilometre

$K_m$ : Michaelis-Menten Sabiti

KV: Kaplumbağa Vadisi

KY: Karapas Yüksekliği

M: Molar

MAPK: Mitojenik Aktif Edilmiş Protein Kinaz

ml: mililitre

mm: milimetre

mM: milimolar

mmol: milimol

NADP<sup>+</sup>: NADPH'nin yükseltgenmiş hali

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

nm: nanometre



NV: Nar Vadisi

OC: Organik klorlu bileşikler

OP: Organik fosfatlı bileşikler

OS: Oksidatif Stres

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

PCB: Kompleks kimyasal karışımları

PU: Plastron Uzunluğu

PY: Piretiroit

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

rpm: dakika başına devir

T: Testosteron

UV: Ultraviyole ışın

$V_{maks}$ : enzimin maksimum aktivite gösterdiği andaki hızı

$\alpha - NA$  (1 – NA): Alfa (1)-Naftol

$\alpha - NB$  (1 – NB): Alfa (1)-Naftil Bütirat

$\delta - ALAD$ : delta - aminolevulinat dehidrataz

# ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa

<b>Şekil 1.1.</b> <i>Testudo graeca</i> 'nin yayılış alanı .....	2
<b>Şekil 1.2.</b> <i>Testudo</i> cinsinin Türkiye'deki dağılımı .....	2
<b>Şekil 1.3.</b> Kara Kaplumbağalarında femoral (uyluk) tüberkülü .....	3
<b>Şekil 1.4.</b> Türkiye'de bulunan iki kara kaplumbağası olan <i>Testudo graeca</i> (sağ) ve <i>Testudo hermanni</i> 'nin (sol) morfolojik olarak karşılaştırılması .....	3
<b>Şekil 1.5.</b> Kara kaplumbağalarında üreme fenolojisinin şematik gösterimi .....	10
<b>Şekil 1.6.</b> Embriyonik ve yumurta çıkışı sonrası fenotipe etki eden faktörler ..	10
<b>Şekil 1.7.</b> 1996 – 2008 yılları arasında omurgalı sınıflarında kontaminant ilgili yayınların dağılımı .....	16
<b>Şekil 1.8.</b> ISI Web of Science dan alınan verilere göre 1996 – 2008 yılları arasında amfibi ve sürüngenlerde yıllık bilimsel yayın sayıları .....	17
<b>Şekil 1.9.</b> Yıllara göre yapılan kirletici bazlı çalışmaların kontaminant tipine göre dağılımı .....	18
<b>Şekil 1.10.</b> Yıllara göre sürüngenlerde yapılan kirletici bazlı çalışmaların taksonomik gruplara göre dağılımı .....	18
<b>Şekil 1.11.</b> Saha çalışmalarına odaklanmada yanıt hassasiyeti ve ekolojik ilişki .....	22
<b>Şekil 1.12.</b> Asetilkolinesteraz (E-OH) inhibisyon mekanizmaları .....	24
<b>Şekil 1.13.</b> Karboksilesteraz inhibisyon (CbE – OH) mekanizmaları .....	26
<b>Şekil 1.14.</b> Oksidatif hasar ile ilişkili çevresel faktörler ve oksidatif stres yanıtları .....	28
<b>Şekil 1.15.</b> Glutatyon Redüktaz ile okside glutatyon indirgenir .....	30

<b>Şekil 1.16.</b> Steroidogenez: bir Testosteron molekülü (A) ve bir Estradiol molekülü (B) .....	31
<b>Şekil 2.1.</b> Çalışma alanlarının Türkiye'deki yerinin gösterimi .....	33
<b>Şekil 2.2.a.</b> Kaplumbağa Vadisi'nin genel görüntüsü .....	34
<b>Şekil 2.2.b.</b> Kaplumbağa Vadisi'nde kara kaplumbağalarının izlendiği alan. ....	35
<b>Şekil 2.3.a.</b> Nar Vadisi'nin genel görüntüsü. ....	36
<b>Şekil 2.3.b</b> Nar Vadisi'nde kara kaplumbağalarının izlendiği alan. ....	36
<b>Şekil 2.4.</b> Kara kaplumbağası kabuğunun boynuzumsu (sol) ve kemiksi (sağ) elementleri .....	37
<b>Şekil 2.5.</b> Karapastaki marjinal plakları delinerek işaretlenmiş bireyler .....	38
<b>Şekil 2.6.</b> Kara kaplumbağasında kardiyosentez ile kan alma .....	43
<b>Şekil 3.1.</b> Kara kaplumbağalarında ekto-parazit olarak bulunan erkek (sol) ve dişi (sağ) <i>Hyalomma aegyptium</i> . ....	57
<b>Şekil 3.2.</b> 2012 yılı Ocak, Şubat ve Mart aylarındaki kar örtüsü değerleri .....	59
<b>Şekil 3.3.</b> Hibernasyondan çıkış dönemi için sıcaklık ve güneşlenme değerleri .....	60
<b>Şekil 3.4.</b> Her iki alanda hibernasyondan çıkış dönemi için yağış ve nem değerleri .....	60
<b>Şekil 3.5.</b> Hibernasyona giriş dönemi için ortalama yağış ve nem değerleri ....	61
<b>Şekil 3.6.</b> Hibernasyona giriş dönemi için, ortalama hava sıcaklığı ve güneşlenme değerleri .....	62
<b>Şekil 3.7.</b> Nisan – Ekim ayları arası yağış ve güneşlenme değerleri .....	63
<b>Şekil 3.8.</b> Ocak – Mayıs arası ortalama sıcaklık değerleri .....	64
<b>Şekil 3.9.</b> Alanlara göre Kolinesteraz & Asetiltiyokolin iyodid etkileşimi .....	66

<b>Şekil 3.10.</b> Alanlara göre Kolinesteraz & Asetiltiyokolin iyodid etkileşiminde karapas uzunluğunun etkisi .....	67
<b>Şekil 3.11.</b> Alanlara göre Kolinesteraz – Bütiriltiyokolin iyodid etkileşimi .....	68
<b>Şekil 3.12.</b> iso-OMPA'nın artan konsantrasyonunun substratların ChE enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	69
<b>Şekil 3.13.</b> AcSCh ve BuSCh in katalitik etkinliği .....	70
<b>Şekil 3.14.</b> Farklı substrat ve konsantrasyonlarının CbE aktivitesine etkisi .....	74
<b>Şekil 3.15.</b> CbE & 1-NA etkileşiminin aylara göre ölçülen değerleri .....	75
<b>Şekil 3.16.</b> Aylara göre alanlardaki CbE & 1-NA etkileşimini değerlendirmede karapas uzunluğunun etkisi .....	75
<b>Şekil 3.17.</b> Aylara göre alanlardaki CbE & 1-NB etkileşimi .....	76
<b>Şekil 3.18.</b> Aylara göre alanlardaki CbE & 4-NPA etkileşimi .....	78
<b>Şekil 3.19.</b> Aylara göre alanlardaki CbE & 4-NPB etkileşimi .....	79
<b>Şekil 3.20.</b> <i>in vitro</i> Chlorpyrifos-okson'un artan substrat konsantrasyonunun CbE enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	81
<b>Şekil 3.21.</b> <i>in vitro</i> carbaryl'in artan her iki substrat konsantrasyonunun CbE enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	82
<b>Şekil 3.22.</b> Aylara göre her iki alanda GST enzim aktivitesi, karapas uzunluğu ve kondisyon faktörünün birlikte değerlendirilmesi .....	87
<b>Şekil 3.23.</b> Aylara göre GST aktivitesi ile karapas uzunluğu ve kondisyon faktörü arasındaki ilişkiler .....	88
<b>Şekil 3.24.</b> Eşeylere göre GST aktivitesindeki değişme .....	89
<b>Şekil 3.25.</b> GST enzim aktivitesine Alan X Ay a göre kene varlığının etkisi .....	90
<b>Şekil 3.26.</b> Alanlara göre genel glutatyon redüktaz enzim aktivitesi .....	91

<b>Şekil 3.27.</b> Aylara göre glutatyon reduktaz enzim aktivitesi .....	92
<b>Şekil 3.28.</b> Alan X Ay ve karapas uzunluğu matrisinde glutatyon redükraz aktivitesi ilişkisi .....	93
<b>Şekil 3.29.</b> Nar vadisi ve Kaplumbağa vadisi bireylerinde ölçülen GPx aktivitesi . .....	94
<b>Şekil 3.30.</b> Aylara göre eşey hormonları düzeyi .....	97

# TABLolar DİZİNİ

Sayfa

<b>Tablo 1.1.</b> Ülkemizde Testudo cinsi ile yapılan bazı çalışmalardan bölgelere göre örnekler .....	4
<b>Tablo 1.2.</b> Çeşitli sürüngen türlerinde dişiler için eşeyssel olgunluklarında vücut büyüklüğü ve olgunluk yaşı .....	6
<b>Tablo 1.3.</b> Kara kaplumbağalarının besinlerini oluşturan bitkilerin familyaları ve kültür bitkileri türleri .....	7
<b>Tablo 1.4.</b> Ekotoksikolojinin tarihsel gelişimindeki önemli noktalar .....	12
<b>Tablo 1.5.</b> Sürüngenlerde biyoindikatör enzimleri de kapsayan bazı ekotoksikolojik araştırmalar .....	14
<b>Tablo 1.6.</b> Risk altındaki sürüngenlerin statüleri .....	15
<b>Tablo 1.7.</b> Esteraz tipleri ve organik fosfatlı (OP) bileşiklerle etkileşimi .....	23
<b>Tablo 1.8.</b> AChE ve BChE nin birbirinden ayrılan enzimolojik özellikleri .....	25
<b>Tablo 2.1.</b> Kara Kaplumbağası Saha Çalışması Veri Formu .....	39
<b>Tablo 2.2.</b> Nar Vadisi'nde varlığı bilinen insektisitler ve zamana göre kullanımları .....	42
<b>Tablo 2.3.</b> Kullanılan kuyucukların özellikleri .....	50
<b>Tablo 3.1.</b> Nar Vadisi ve Kaplumbağa Vadisi kara kaplumbağasının aylara göre örneklem tablosu .....	53
<b>Tablo 3.2.</b> Kaplumbağa Vadisi kara kaplumbağaları örneklerinde ortalama boy uzunlukları ve ortalama ağırlıkları .....	54
<b>Tablo 3.3.</b> Nar Vadisi kara kaplumbağaları kara kaplumbağaları örneklerinde ortalama boy uzunlukları ve ortalama ağırlıkları .....	55

<b>Tablo 3.4.</b> Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisinde kara kaplumbağalarında saptanan kene enfestasyonu .....	57
<b>Tablo 3.5.</b> ChE – AcSCh etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler .....	66
<b>Tablo 3.6.</b> ChE – BuSCh etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler .....	67
<b>Tablo 3.7.</b> iso-OMPA'nın substratların ChE enzim aktivitesi üzerine etkisi .....	69
<b>Tablo 3.8.</b> Farklı substratlar ve konsantrasyonları ile CbE enziminin etkinliği .	73
<b>Tablo 3.9.</b> 1-NA - CbE etkileşimini değerlendirmede kullanılan etkili faktörler .	74
<b>Tablo 3.10.</b> 1-NB - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler .....	76
<b>Tablo 3.11.</b> 4-NPA - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili olan faktörler .....	77
<b>Tablo 3.12.</b> 4-NPB - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler .....	78
<b>Tablo 3.13.</b> <i>in vitro</i> Chlorpyrifos – okson farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının CbE aktivitesi üzerine etkisi .....	80
<b>Tablo 3.14.</b> <i>in vitro</i> karbaril uygulaması .....	81
<b>Tablo 3.15.</b> GST enzim aktivitesini değerlendirmede etkili faktörler .....	86
<b>Tablo 3.16.</b> Glutatyon redüktaz enzim aktivitesini etkileyen ay alan ve karapas uzunluk faktörleri .....	91
<b>Tablo 3.17.</b> GPx enzim aktivitesini etkileyen alan faktörü .....	94

# 1.GİRİŞ

“Bir kaplumbağanın bacakları içe çekmesi gibi, bilgelik de istendiğinde kendini akla çeker.”

Bhagavad Gita

Kaplumbağalar, uzun ömürlü, *kabukları* ile zırhladıkları özel bir morfolojiye sahip olmaları nedeniyle insanoğlunun yaşamında her daim rast gelebildiği hayvanlardandır. Bu çalışma ile ülkemizin turistik olarak önemli noktalarından olan Kapadokya Bölgesi'nde kaplumbağaların yaşam döngüleri için uygun alanlara sahip olduğu belirlenen iki vadideki (Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi) *Testudo graeca* Linnaneus, 1758 (kara kaplumbağası) türü bireyleri üzerinde bazı ekotoksikolojik araştırmalar yapılmıştır [1]. Bu bağlamda sahadan elde edilen populasyonun biyolojisi ve yaşam kalitesini etkileyebileceği düşünülen tarımsal ilaçların kullanım durumları, laboratuvarında değerlendirilen hedef enzimler ve hormonlar gibi bazı biyobelirteçlere karşı yanıtları ile, türün Nevşehir ilinde temsil edilen bireylerinin durumu enzimatik ve endokrinolojik yönden değerlendirmeye çalışılmıştır.

Genel bir perspektif ile *Testudo* cinsi kaplumbağaların Palearktik'in güneydoğusuna neredeyse tamamen yayıldığı ve bu yayılmanın yüksek derecede temsilini sağlayan türün de *Testudo graeca* türü olduğu ifade edilebilir. Bu sayede *Testudo graeca* 'nın 6500 km'lik Doğu – Batı yayılım şeridinin Doğu İran'dan, Fas'ın Atlantik kıyılarına; 1600 km'lik Kuzey – Güney yayılım şeridinin ise Romanya'nın Tuna Deltası'ndan Libya Sirenayka Yarımadası'na değin uzanır (Şekil 1.1.) [2].

Tarım amaçlı kullanılan alanlar da dahil olmak üzere, kumlu, taşlı ve kuru arazilerde ya da yarı bozkır ve ormanlık habitatlarda yaşar [3].

Bununla beraber, rakım bakımından da deniz seviyesinden, 2700 metre yüksekliğe kadar olan bölgelerde elde edilen kayıtları farklı çevresel koşullarda da yaşayabildiğini göstermektedir [4].

Genel anlamda sürüngenleri etkileyen faktörlerin kara kaplumbağalarını da etkileyeceği yadısanamaz [5-8]. Akdeniz Havzasının simge canlılarından biri olan bu türün, dağılım gösterdikleri bu alanlarda populasyon yoğunluklarının

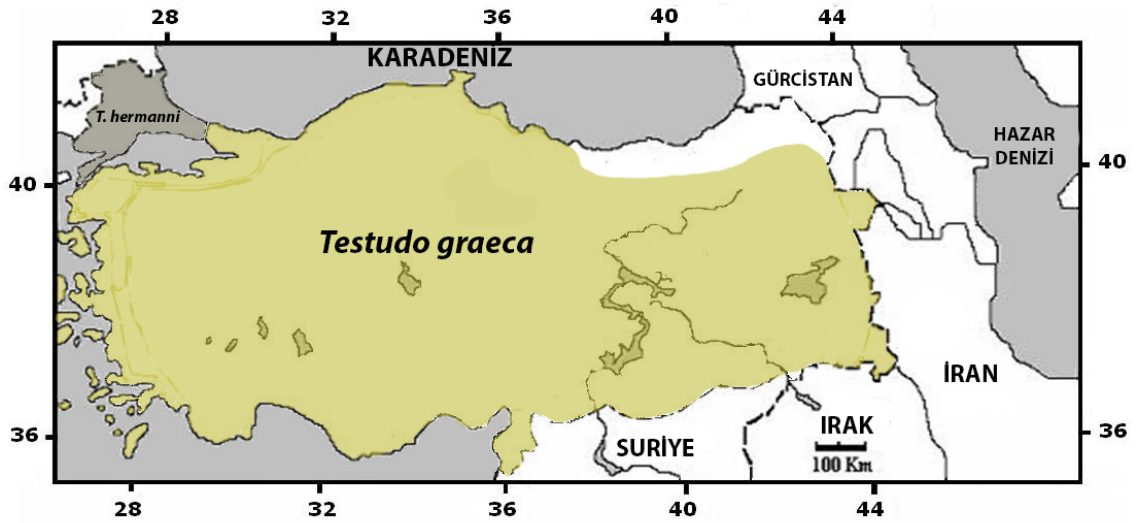


azalmasına ilişkin bir sonucu olarak IUCN Kırmızı Listesindeki kategorisi “zarar görebilir (VU: Vulnerable)” olarak kategorilendirilmiştir [9].



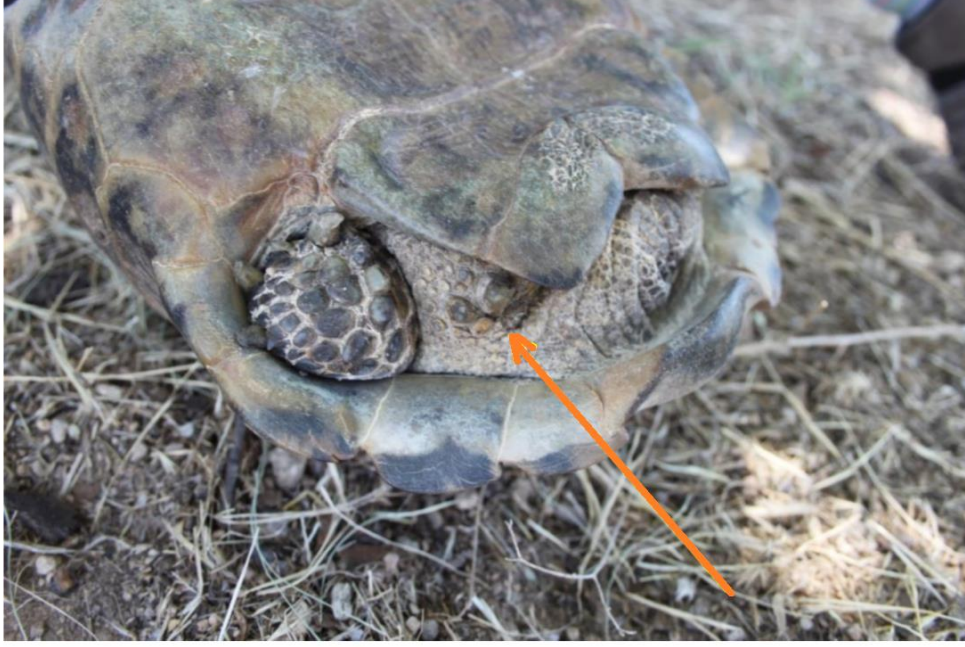
Şekil 1.1.: *Testudo graeca*'nin yayılış alanı [2]

Ülkemizde Doğu Karadeniz bölgesi hariç hemen hemen tüm bölgelerde geniş bir yayılım gösterirler (Şekil 1.2) [3].



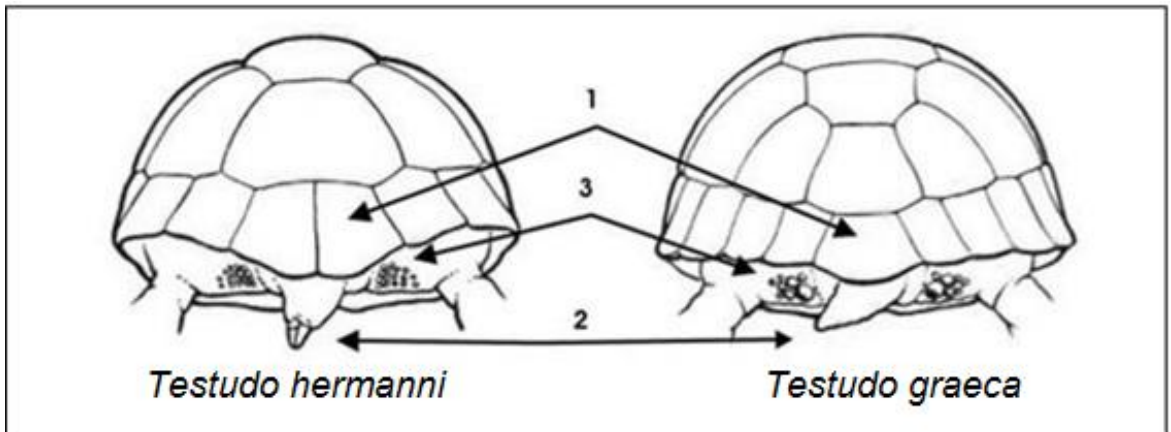
Şekil 1.2. *Testudo* cinsinin Türkiye'deki dağılımı [3]

Bu kaplumbağalarda, arka bacağıın alt tarafında ve kuyruğa yakın kısımlarda, “femoral tüberkül” adı verilen iki sert çıkıntı bulunduğundan, tür “iğne – uyluklu kaplumbağalar” olarak da bilinmektedir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Kara Kaplumbağalarında femoral (uyluk) tüberkülü görülmektedir (ok).

Testudo cinsi, ülkemizde *T. graeca* dışında *Testudo hermanni* (Gmelin, 1789) ile de temsil edilmektedir (Şekil 1.2., 1.4.) [3].



Şekil 1.4. Türkiye’de bulunan iki kara kaplumbağası olan *Testudo graeca* (sağ) ve *Testudo hermanni*’nin (sol) morfolojik olarak karşılaştırılması [1;3].

Karşılaştırıldığında bu iki tür; *Testudo hermanni*lerde suprakaudal plağın çift olması (1) ve kuyruk ucunda tüberkül bulunması (2) ile *Testudo graeca*larda uylukta bulunan tüberküller (3) açısından farklılık göstermesi ile birbirinden ayrılabilir (Şekil 1.4.).

Ülkemizde kara kaplumbağalarını konu alan çalışmalar, daha çok diğer sürüngen gruplarında olduğu gibi taksonomik ya da populasyonlar arası farklılıkları koymaya yönelik çalışmalardır (Tablo 1.1.).

Tablo 1.1.: Ülkemizde *Testudo* cinsi ile yapılan bazı çalışmalardan bölgelere göre örnekler

Bölge	Konu	Araştırmacı(lar)
Trakya Bölgesi	Taksonomi	Çevik E. (1987) [10]
Datça Yarımadası	Populasyon - Taksonomi	Tok V. (1999) [11]
Ege ve Akdeniz Bölgesi	Populasyon – Morfoloji	Taşkavak E. ve ark. (2001) [12]
Güneydoğu ve Ege Bölgesi	Morfoloji ve Seroloji	Türkozan O. ve ark. (2003) [13]
Mardin Bölgesi ve Batı Toros Dağları	Populasyon	Türkozan O. ve ark. (2003) [14]
Türkiye	Morfoloji	Türkozan O. ve ark. (2010) [15]
Kapadokya	Biyoeкологи	Arslan G. (2013) [1]

Mevcut bilgilerimizi, gelişmekte olan yeni bilim alanlarına için de kullanırsak, bir canlının karşı karşıya kaldığı problemleri çözmek için geliştirilen yeni çözüm yollarını anlayabiliriz. Çünkü F. Schumacher'in (1973) dediği gibi "*Doğa için doğru olduğunu düşündüğümüz şeyi yapmalıyız. Çünkü eğer doğru şeyi yapmazsak, yanlış şeyi yapacağız ve iyileşmenin değil felaketin bir parçası olacağız.*" Bu

Çalışma ile de sürüngen ekotoksikolojisine ait veri eksikliği tamamlanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla Nevşehir İlindeki kara kaplumbağalarının Nisan – Ekim 2012 aktif dönemlerinde verdikleri enzimatik ve hormonal yanıtlar ile bu biyobelirteçleri doğrudan / dolaylı etkileyen çevresel kontaminantlar arası ilişkilerin ortaya çıkarılması hedeflenerek, kara kaplumbağalarının bir aktif dönem boyunca fizyolojik ve endokrinolojik mevsimsel örüntüleri belirlenmeye çalışılmıştır. Böylece lkemiz ve yakın coğrafyamızda ilk defa sürüngen ekotoksikolojisini konu alan bir çalışma yürütülmüştür.

## 1.1. *Testudo graeca* ya ilişkin Genel Bilgiler

### 1.1.1. *Testudo graeca* 'nın populasyon biyolojisi

Kara kaplumbağalarının yaşam aralıkları genelde uzun olup, eşeyssel olgunluğa geç ulaşırlar. Populasyon yapılarındaki demografik özellikler iki önemli parametre ile ilişkilidir; bunlar genç bireylerin hayatta kalma başarısı düşük ve/veya değişkenliği ile yetişkinlerin hayatta kalma başarısı yüksek ve sabit olmasıdır. Bu nedenle populasyon duyarlılığı yetişkinlerden yanadır [16;17]. Tablo 1.2.'de çeşitli sürüngen türlerine ait dişi bireylerin vücut büyüklükleri ve olgunluk yaşları görülmektedir.

Tablo 1.2.: Çeşitli sürüngen türlerinde dişiler için eşeyssel olgunluklarında vücut büyüklüğü ve olgunluk yaşı [18].

Takson	Erişkin büyüklüğü (mm)	Olgunluk yaşı (ay)	Maksimum yaş (ay)
<i>Cryptobranchus alleganiensis</i>	330	84	300
<i>Desmognathus quadramaculatus</i>	73	84	124
<i>Eurycea wilderae</i>	34	48	96
<i>Anaxyrus americanus</i>	72	36	60
<i>Lithobates catesbeianus</i>	116	36	96
<i>Chrysemys picta</i>	119	72	360
<i>Geochelone gigantea</i>	400	132	840±
<i>Trachemys scripta</i>	195	50	288
<i>Sphenodon punctatus</i>	180	132	420+
<i>Aspiscelis tigris</i>	80	21	94
<i>Gallotia stehlini</i>	120	48	132+
<i>Uta stansburiana</i>	42	9	58
<i>Diadophis punctatus</i>	235	32	180+
<i>Pituophis melanoleucus</i>	790	34	180+

Bu duruma ek olarak, kara kaplumbağalarının (Familya: Testudinidae) dispersal yeteneklerinin sınırlı olması, bu grubun sürüngenlerin zayıf halkası olarak tanımlanmasına neden olmaktadır. Genel olarak familyada yer alan 32 türün 26 sı küresel anlamda tehlike altındadır. Daha dar alan olarak, bu anlamda 3 *Testudo* türü (*T. graeca*, *T. kleinmani*, *T. horsfieldi*) Paleartik Bölgede öne çıkar [19;20].

Kaplumbağalar gibi poikloterm hayvanların metabolik gereksinimlerinin düşüklüğü nedeniyle beslenme süreleri sınırlıdır [18]. Besin gereksinimindeki görece esnek sergilenen tutum, kara kaplumbağalarını olağandışı mevsimsel ve

yıllık dalgalanmalarda canlıya yardımcıdır. Bu nedenle besin nitelik, nicelik ve bolluğuna göre mevsimsel değişikliklere de uyumlu olarak canlının diyet değişikliği de gündeme gelebilmektedir [21].

Kara kaplumbağaları yaklaşık %96.5 vejetaryen bir diyete sahip olup, aşağıdaki tablo (Tablo 1.3) ile hangi bitki taksonlarını doğal ya da kültür bitkisi olarak tüketebildiği görülmektedir:

Tablo 1.3: Kara kaplumbağalarının besinlerini oluşturan bitkilerin familyaları ve kültür bitkileri türleri [6;21;22]

Doğal bitkiler	Kültür bitkileri
Aizoaceae, Brassicaceae, Scrophulariaceae	Yonca ( <i>Medicago sativa</i> )
Alsinoideae, Geraniaceae, Solanaceae	Patates ( <i>Solanum tuberosum</i> )
Caryophyllaceae, Fabaceae, Poaceae	Domates ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
Chenopodiaceae, Malvaceae, Rubiaceae	Marul yaprağı ( <i>Lactuca sativa</i> )
Asteraceae, Umbelliferae, Lamiaceae	Yeşil biber ( <i>Capsicum sp.</i> )
Convolvulaceae, Plantaginaceae, Apiaceae	Maydanoz ( <i>Petroselinum crispum</i> )
Brassicaceae, Polygonaceae, Ranunculaceae	Patlıcan ( <i>Solanum melongena</i> )

2000'li yılların ortalarına doğru yapılan bir çalışmada bitki örtüsünün kaybı ve kuraklık gibi faktörlerin, kara kaplumbağalarının popülasyonlarının tarım alanlarının etrafında yoğunlaşmasına ve beslenme alışkanlıklarının da kültür bitkileri yönünde değişmesine neden olduğu rapor edilmiştir [6].

Ancak kara kaplumbağalarının besin içeriklerinden söz edilirken nadir olarak da olsa mantar, böcek, kemik ve toprak gibi materyalleri de tüketebildiğini söyleyebiliriz [22;24-26].

Kara kaplumbağalarında bireysel olarak yaşam kalitelerini etkileyip, orta ve uzun vadede popülasyonlarının demografik yapılarını etkileyebilecek bir diğer nokta da

iç (endo) ve dış (ekto) parazitlerin kaplumbağaları konak olarak kullanabiliyor olmasıdır [5,27].

Bazı istisnalarla beraber, karasal kaplumbağaları etkileyen tek helmint, nematod grubu olup, Paleartik kaplumbağaları etkileyen Helminthofauna üyeleri olarak *Pharyngodonidae*, *Atractidae*, *Ascarididae* ve *Capillariae* familyalarına ait türleri, yaygın parazit cinsi olarak da *Tachygonetria* rapor edilmiştir [5;28;29].

Ektoparazit olarak gözlenen en büyük canlı grubu, zorunlu kan emici olan ve Dünya'da 800'den fazla türü tanımlanan kene (Ixodida) üst familyasıdır [27,30]. Bu Ixoid türlerinden *Hyalomma aegyptium*, *Haemaphysalis sulcata*, *H. inermis* ve *Rhipicephalus sanguineus* bireylerinin *Testudo* cinsi kaplumbağaları konak olarak kullandıkları rapor edilmiştir [31].

### **1.1.2. *Testudo graeca*'nın aktivite biyolojisi**

Vücut sıcaklığı çoğu sürüngen türünde, hem davranış ve fizyolojik mekanizmalar gibi iç dinamiklere hem de poiklotermik hayvanların doğası gereği çevresel faktörler gibi dış dinamiklere fazlasıyla duyarlıdır [32].

Kara kaplumbağalarında yüksek aktivite dönemleri, çevre şartlarına göre, eşeyssel olarak da farklılık gösteren bir süreç olarak ifade edilebilir. Erkek bireyler, sıcaklığın 12°C 'ye kadar düştüğü soğuk kış koşullarında; dişi bireyler ise sıcaklığın 41°C'ye kadar yükseldiği sıcak yaz koşullarında günlük aktivitelerini sürdürebilirler. Bu şekilde ekstrem sıcaklıklarda sergilenen aktivitenin, eşeyler arasında farklı olması, üreme davranışları arasındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Zira üreme döngülerinin kritik zamanı eşeyler arasında değişkenlik göstermektedir. Kritik zaman, dişiler için yuva yeri arama, erkekler içinse eş arama davranışlarının sergilendiği dönemdir [33].

### **1.1.3. *Testudo graeca* 'nın üreme biyolojisi**

Kara kaplumbağalarının yıllık üreme döngüsü içerisinde iki dönem çifleşme davranışı vardır: İlkbahar ve Sonbahar dönemi. Bu canlılarda bir dişi üreme dönemi içerisinde birden çok erkekle çiftleşebilir yani poliandri gözlenebilir [34].

Sürüngenlerde üreme biyolojisi birleştirilmiş, ayrıştırılmış ve sürekli üreme modeli olmak üzere üç başlık altında toplanır. Bu üreme modellerini belirleyici unsur ise türün yaşadığı çevredir [35].

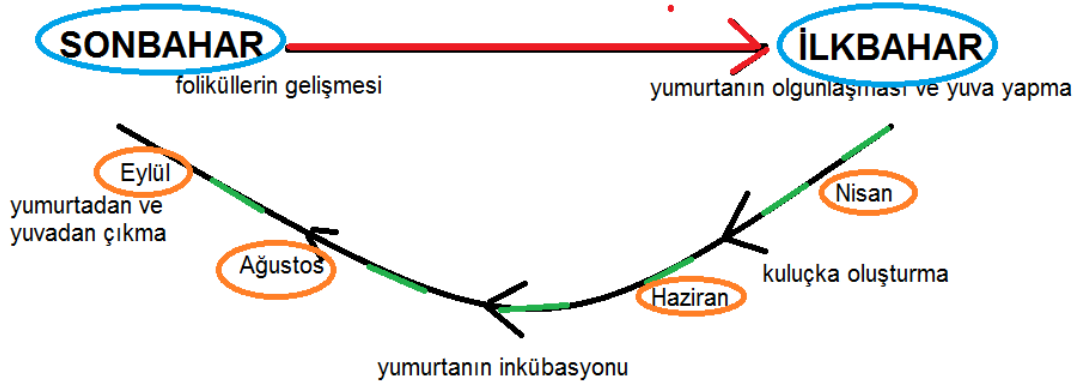
Kara kaplumbağalarının testislerinde sonbahar aylarında tamamlanan spermatogenez ile üretilen spermler, ilkbahar aylarındaki çiftleşme döneminde kullanılır. Kış mevsiminde ise testislerde gerileme olur. İlkbahar ve sonbahar çiftleşme dönemlerinde gelişen testislerde sertoli ve leydig hücrelerinin beraber işlev görmesi spermatogenez ve steroidogenezin eş zamanlı olduğunu gösterir. Kış aylarında steroidogenik aktivitenin düştüğü sonbaharda ve hibernasyondan çıktıktan sonra ise androjen sentezinin arttığı belirtilmektedir [1,36].

Dişi bireylerde ise ilkbahar çiftleşme döneminde kalsifiye yumurtalar uterusda hazır olarak bulunur. Uterustaki bütün yumurtalarda eş zamanlı olarak kabuk oluşur ve bu kalsifiye yumurtalar tek bir kuluçkada bırakılır. İkinci bir kuluçkanın oluşturulduğu durumlarda, ikinci kuluçkadaki yumurtaların kalsifikasyonu da eş zamanlı gerçekleşir. Endoskopik çalışmalar ovaryumların mevsimsel gerileme olmadan bütün yıl boyunca aktif olduğunu göstermiştir [1;37].

Kara kaplumbağalarında ayrıştırılmış üreme modelinin, uzun üreme dönemiyle uyumlu bir strateji izlediğini, bu canlıların yüksek eforlu eş arama aktivitesi göstermeden, İlkbahar ve Sonbahar aylarında havaların uygun olduğu koşullarda karşılarına çıkan dişilerle çiftleşmesinden anlayabiliriz. [36].

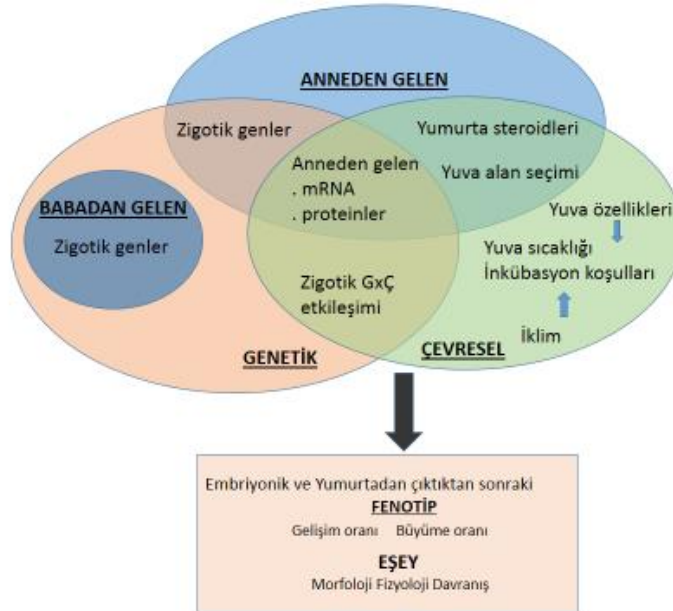
Bu tip ayrıştırılmış üreme modeli sergileyen türlerde eşey hormonlarının seviyesinin artışı, gametogenez, çiftleşme ve yumurtanın döllenenmesi eş zamanlı değildir. Bu sayede üreme maliyeti minimize edilmiş olur. Diğer bir durum da, çevre sıcaklığı gibi çevresel etmenlerin, gonadal steroid hormon seviyesinin artışından daha çok çiftleşme davranışını tetiklemesi durumudur [38]. Kara kaplumbağalarının üreme fenolojileri şekil 1.5. de açıklanmıştır.





Şekil 1.5: Kara kaplumbağalarında üreme fenolojisinin şematik gösterimi. Sonbaharda foliküllerin gelişmesi, ilkbahar aylarında yumurtanın olgunlaşması ve yuva yapma [39], Nisan-Ağustos aylarında yumurtanın inkübasyonu [20], Ağustos ve Eylül aylarında yumurtadan ve yuvadan çıkma [39] şeklinde sıralanabilir. Kuluçka oluşturma Nisan-Haziran aylarında tamamlanır.

Embriyonik gelişimin sıcaklığa duyarlı dönemi olarak bilenen kritik bir dönemdeki inkübasyon sıcaklığı, birçok sürüngen türünde gonadların eşeysel farklılaşması ile cinsiyetin belirlenmesine neden olur. Sıcaklığa duyarlı dönem, embriyonik gelişimin zaman olarak %18-30'una karşılık gelmektedir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6.: Embriyonik ve yumurta çıkışı sonrası fenotipe etki eden faktörler [18]

## 1.2. Ekotoksikoloji ve Kaplumbağa

### 1.2.1. Kısaca Ekotoksikoloji

*“Diğer yaşam ortamlarına olan zararlı etkilerin yalnızca memeli kaynaklı alışılabilir zehirli maddelerden kaynaklanıyor olması şeklinde bir görüşe katılmıyoruz. Eğer çevresel öğelerin dengesini bozacak düzeyde bulunuyorsa, azot veya karbondioksit bile birer çevre kirleticisidir.”*

Newman ve Clements, 2008

Çevresel kirlenici olan çeşitli kimyasalların doğal sistemler üzerindeki etkilerini inceleyen ekotoksikoloji, toksik maddelerin canlılar ve ekosistem üzerindeki etkilerin araştırılmasını, gösterilmesini ve risk değerlendirilip, yönetimini hedefler. Ekotoksikoloji, doğal ekosistemler ya da hedef olmayan türler üzerinde potansiyel toksik ajanların etkilerini tahmin etmeye olanak sağlayan, bununla da sınırlanmayıp, endüstriyel gelişim, insan sağlığı gibi önemsenen alanlarda alınabilecek tedbirler için sofistike yaklaşımlar sunabilecek bir bilim dalıdır.

Dünyanın dört bir tarafında başta DDT olmak üzere, çok çeşitli kimyasalların canlılara ve ekosisteme etkisi üzerine yapılan çalışmalar ne yazık ki iyi bir tablo sunmamaktadır. Tablo 1.4 çeşitli kimyasalların ekosistem üzerindeki etkilerinin tarihsel gelişimini göstermektedir. Günümüzde ise bilinen etkileri nedeniyle organofosfatlı pestisitler dahi sıkıntı sıkıntı oluşturmaktadır ve yapılan ekotoksikolojik çalışmalar bu yöne kaymaktadır [40].

Tablo 1.4.: Ekotoksikolojinin tarihsel gelişimindeki önemli noktalar

Tarih	Kirleticiler veya bir bilim insanının atılımı	Etkisi veya yapılan çalışma
1850ler	Kömür yanma reaksiyon ürünleri	Güvelerde endüstriyel melanizm
1863	Endüstriyel atık sular	İlk toksikoloji testleri
1874	Kurşun atışları	Su kuşu ve sülün ölümleri
1887	Maden yataklarından Ar emisyonu	Geyiklerde ve tilkilerde ölümler
1927	Petrol sahalarında hidrojen sülfidler	Memeli ve kuşlarda tükenmeler
1950ler	DDT ve organik klorlu pestisitler	Balık yiyen kuşların yumurta zarında incelmeler
1969	Rene Truhaut	Ekotoksikolojiyi tanımlama
1970ler	Toksik atıkların karışımı	İnsan, sucul ve yaban hayatı sağlığına etkiler
1972	DDT	ABD'de yasaklanıyor
1980ler	Tarımsal tahribatlar ve radyoaktif maddeler	Gelişim bozuklukları ve üremede harabiyet
1990lar	Kompleks kimyasal karışımları (PCBler)	Endokrin bozucular
1997	Heller ve ark.	İlk toksikogenomik çalışma
2000lerin başı	Çevresel stress etmenleri	Genomik ve proteomik bilgilerini ekotoksikolojide kullanma

Organik fosfatlı pestisitler halen daha birçok gelişmekte olan ülkede yetersiz düzenlemeler ile kullanılmakta olup; insan ve ekosisteme daha fazla zarar vermektedir [40].

### 1.2.2. Kara kaplumbağası ve sürüngenlerin durumu

Sürüngen popülasyonlarındaki azalmalar, farkedilmemiş ya da yeterli çalışmalar ile belgelendirilmemiştir. Bugün sürüngenlerin sadece çeşitli habitatlarla ekolojik uygunluğu ile sınırlı olmayıp, aynı zamanda diğer türlerin yaşadığı çevresel sağlığın bozulması kaynaklı bir nedene de işaret ettiği söylenebilir. Sürüngenleri koruma isteği ve onların ekolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi, statülerinin, dağılımının ve azalmalarına neden olan faktörlerin iyi bilinmesini gerektirir.

Genel kapsamda sürüngen popülasyonunun azalmalarına neden olan durumlar Gibbons ve ark. (2000) yayımladıkları "The Global Decline of Reptiles, Déja Vu

Amphibians”ta vurgulanmıştır [41]. Sürüngen populasyonlarındaki bu azalmayı, habitat kaybı ve bozulması, işgalci (invasif) türlerin habitatlarına eklenmesi, çevre kirliliği, hastalıklar, sürdürülemez kullanım ve küresel iklim değişikliği etkiler.

İnsektisit, herbisit, ağır metal ve radyoaktif atık gibi kontaminantların salınımı küresel ölçekte sürüngenlerin azalma nedenleri arasında sayılmaktadır [41]. Sürüngenler ekolojik ve yaşam tarihi karakterini sergilediklerinde, onların kontaminantlara özellikle hassas oldukları görülebilir [42]. Birkaç kertenkele ve kaplumbağa türü dışında, sürüngenler tam anlamıyla karnivordurlar ve bir çoğu besin ağlarında yüksek trofik pozisyonda yer alırlar. Bu nedenle, sürüngenler kirleticilerin birikim kaynaklı riskleri ile de karşı karşıyadırlar. Ek olarak, bazı sürüngenlerin uzun ömürlü ve benzer boyutlardaki homoitermal hayvanlara kıyasla küçük yaşam alanına sahip olmaları, bu canlıları uzun dönemli kirlitici maruziyetine ve sonradan gelen biyoakümüülasyona duyarlı hale getirmiştir [42;43;44]. Sürüngenler, özellikle yüksek derecede kontaminant kaynaklı risklere hedef olsa da, ekotoksikolojide halen en az çalışılan omurgalı gruptur [42]. Dünya üzerinde sürüngen ekotoksikolojisi üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında Kuzey Amerika kaynaklı araştırmaların yaygın olduğu görülür. Timsahlar ve deniz kaplumbağalarının başını çektiği bu dağılım yüzünden, sürüngenlerin diğer cinsleri üzerine toksik maddelerin etkisinin gösterildiği çalışmalar sınırlı kalmıştır [45].

Önceki çalışmalar sürüngenlerin yaşamlarını sürdürmelerini direk olarak etkileyen, mortalite ile sonuçlanan gözlemler üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin, pestisit uygulaması gibi kasıtlı müdahale, kazara dökülme veya kontaminant sızıntısı gibi etkenler sürüngenlerin ölüm nedenleri olarak rapor edilmiştir [46]. Ancak çok az araştırmacı populasyon azalmasını bu nedenle ortaya çıkan ölümler ile ilişkilendirmiştir. Bununla birlikte Romero ve Wilkelski (2002), Galapagos deniz iguanaları (*Amblyrhynchus cristatus*) populasyonunun azalmasının, düşük seviyedeki petrol sızıntısından sonra yaşandığını rapor etmişlerdir [47]. Romeo ve Wilkeski'nin bu çalışma ile vurguladığı nokta, iguana ölümlerinin, bu canlıların diyetlerindeki deniz alglerinde petrol kalıntısı bulunması ve bu sayede son bağırsakta sindirime katılan bakterilerin alglerin içerdiği petrol etkisi ile ölmesine bağlı yaşadıkları açlıktan kaynaklandığını ifade etmesi çarpıcıdır. Direk mortalite kadar açık olmasa da, sürüngen populasyonlarına uzun süreli zarar verebilecek

diğer bir husus da, kontaminantların subletal etkileridir. Sürüngenlerin biyobelirteç olarak kullanıldığı, kirleticilerle ilişkili bazı çalışmaları gerek sahadan elde edilen örneklerle gerekse laboratuvar uygulamaları ile gösteren Tablo 1.5.'de sunulmuştur.

Tablo 1.5.: Sürüngenlerde biyoindikatör enzimleri de kapsayan bazı ekotoksikolojik araştırmalar

Model grup	Çalıştığı konu	Araştırmacı
Kertenkele ( <i>G.gallotia</i> )	Serum B esteraz enzimleri	Sanchez-Hernandez (2004) [48]
4 kaplumbağa türü	Civa konsantrasyonları	Bergeron ve ark. (2007) [44]
Kertenkele ve yılan	Lokomotor performans, kontaminantların subletal etkisi	Hopkins ve ark. (2005) [49]; Holem ve ark. (2006) [50]; Hopkins ve Winne [51] (2006); DuRant ve ark. (2007) [52]
Kertenkele ve yılan	Metabolik enerji tüketimi	Hopkins ve ark. (2005) [49]; DuRant ve ark. (2007) [52]
<i>Testudo graeca</i>	δ-ALAD kadmiyum kurşun	Martinez ve ark. (2010) [53]

Bu çalışmalar subletal kontaminant maruziyeti ile populasyon dinamiği arasındaki mekanizmaları anlamamızda yardımcı olsa da, subletal kontaminant maruziyeti ile sürüngen populasyonlarındaki düşüşe neden olan pek az sayıda çalışma mevcuttur. Florida'da bir gölde, östrojenik bileşiklerle kontamine olmuş Amerikan timsahı (*Alligator mississippiensis*) populasyonlarında düşmeye, azalan

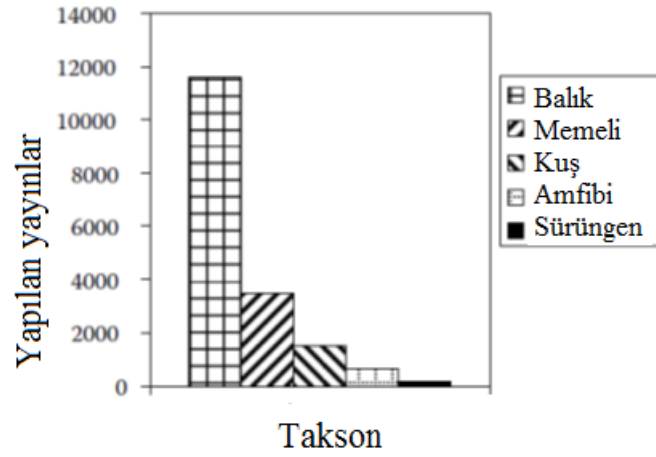
testosteron seviyesi ve gonadal malformasyon ile sonuçlanan üreme başarısızlığının neden olduğu gösterilmiştir [54;55]. Benzer şekilde, Shelby ve Mendonca (2001) kirlenen habitatlardaki bazı sarı benekli harita kaplumbağası (*Graptemys flavimaculata*) erkeklerinde azalan testosteron seviyesini belirleyerek, bu alanda daha önce gözlenen populasyon düşüşüne kirlenmelerin üreme sistemi üzerine etkisinin olabileceğini ifade etmişlerdir [43]. Her ne kadar çoğu araştırma, kontaminantların indirek etkilerinin endokrin bozucular nedeniyle üreme sistemi üzerine yoğunlaşmış olsa da, kontaminantlara maruziyet ayrıca enerji kazancı ve giderini de etkileyebilir. Hopkins ve ark. (1999), şeritli su yılanları (*Nerodia fasciata*) nın kömür yakıt atıkları ile kirlenmiş sulak alanda kirlenmemiş alana göre iz metallerin dokudaki konsantrasyonların artışına paralel olarak metabolik aktiviteleri %32 daha fazla arttığını rapor etmişlerdir [56].

Sparkling ve ark. (2000), 1972 ile 1998 arası dönem için, 11271 kontaminant atıflı çalışmayı taramışlar ve bunların ancak %1.4 ünün sürüngenler üzerine olduğunu göstermişlerdir [57]. Sürüngenler üzerine olan bu çalışmaların önemli bir kısmı kalıntılarla ilgili olup, diğer sürüngen gruplarına kıyasla deniz ve tatlısu kaplumbağaları (*Chelonia*) en fazla üzerinde durulmuş olmaktadır. Kontaminantların en önemli kategorileri; Metaller (% 24), Organoklorlu pestisitler (OC) (%23) ve poliklorlu bifeniller (PCB) (%19) dir.

Tablo 1.6.: Risk altındaki sürüngenlerin statüleri [8]

Risk altındaki sürüngenler	
Değerlendirilen tür sayısı	664
Ciddi derecede nadir ya da tehlike altında olan	73
Tehlike altında olan	100
Korunmasız olan	125
Toplam (değerlendirme yüzdesi)	298 (%44.9)

Tablo 1.6.dan görüleceği üzere tehlikeye giren sürüngenlerde kontaminantların rolünü saptamak için, daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Zaten 2000li yıllarla beraber, bu konuda yapılan çalışmalar artış gösterse de oransal olarak yine de tatmin edici olmamıştır. 2010 yılı itibariyle, elde edilen sonuçlara göre, 17375 kontaminant atıflı yayında sürüngenler üzerine yapılan çalışmalarda sayıca artış sağlansa da (152), yüzdesel olarak ancak %0.8 düzeyinde bir paya sahiptir (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7.: 1996 – 2008 yılları arasında omurgalı sınıflarında kontaminant ilgili yayınların dağılımı

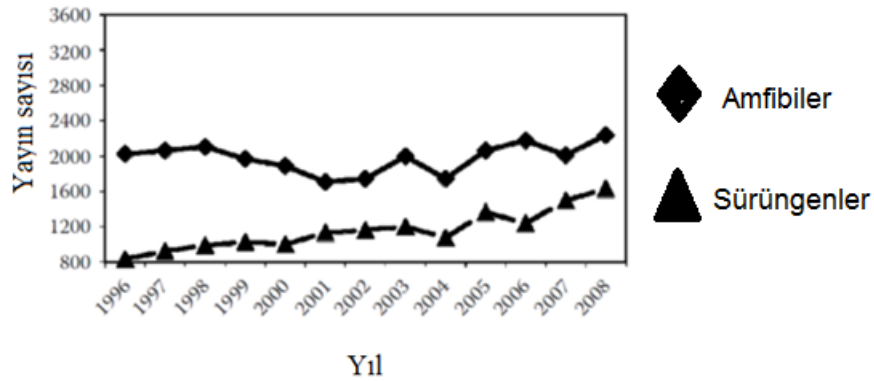
Toplamda, incelenen 15057 sürüngen atıflı çalışmaya göz atıldığında, aşağıdaki kategori yada klasmandaki kontaminantlar tanımlanmıştır:

- 1) pestisitler — halojen olmayan pestisitleri de içerir;
- 2) metaller — özellikle kurşun, arsenik, kadmiyum, çinko, bakır ve civa gibi ağır metallerle beraber, metalloid yada alüminyum gibi belli şartlarda toksik olabilen diğer metaller;
- 3) ultraviyole ışımalar — UVA ve UVB gibi son zamanlarda çevresel seviyesi vurgulanan ışımalar;
- 4) atrazin / herbisitler;
- 5) azotlu bileşikler, özellikle nitratlar, nitritler ve amonyak gibi gübre olarak kullanılanlar;
- 6) PCBler, dioksinler ve furanlar;
- 7) Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH);

8) Organoklorlu pestisitler; endosülfan, diklorodifeniltrikloroetan (DDT) ve diklorodifeniltrikloroetilen (DDE); ve

9) diğer — polihalojen difenil eterleri içeren,deniz kaplumbağalarında mideye giren plastik türevi bileşikler, radyoaktif moleküller, farmasötikler ve çeşitli biyosit ve antiseptikler [57]

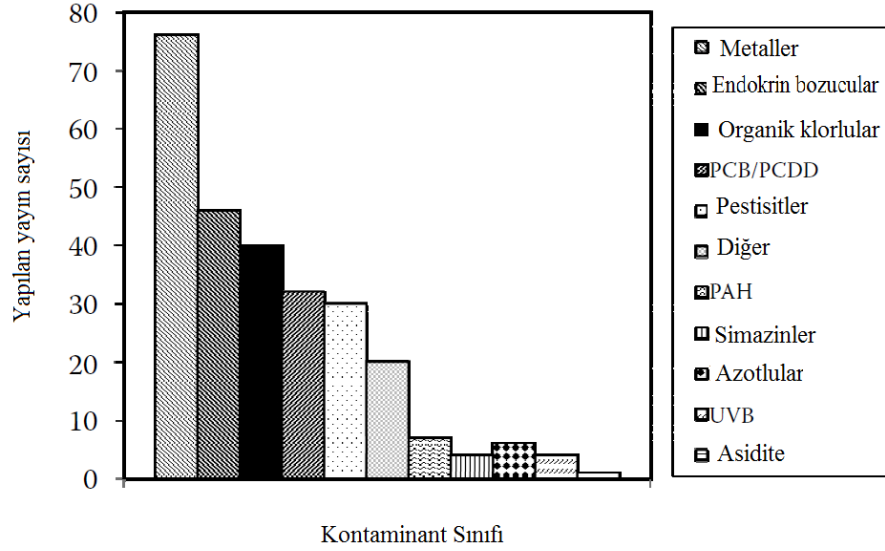
Amfibiler ve sürüngenler çoğu kez bir arada değerlendirildiğinden, aşağıdaki şekilde de bu anlamda bir kıyaslama ortaya koymaktadır: Buna göre, yıldan yıla sürüngenler için kontaminant atıflı olan – olmayan araştırmalarda kaydadeğer artış olduğu, ancak amfibiler için aynı şeyin söylenemeyeceği ifade edilebilir (Şekil 1.8.). Amfibiler, embriyoloji, fizyoloji, genetik, tıp ve insan sağlığı gibi konularda geniş bir araştırma kaynağı sunabilirken, sürüngenlerden bu tip çalışmalarda daha az yararlanılmıştır. Bu canlılar zaman içinde daha çok sürüngen davranışı, ekolojisi ve koruma durumlarına ilişkin çalışmalarla sınırlı kalmıştır [57].



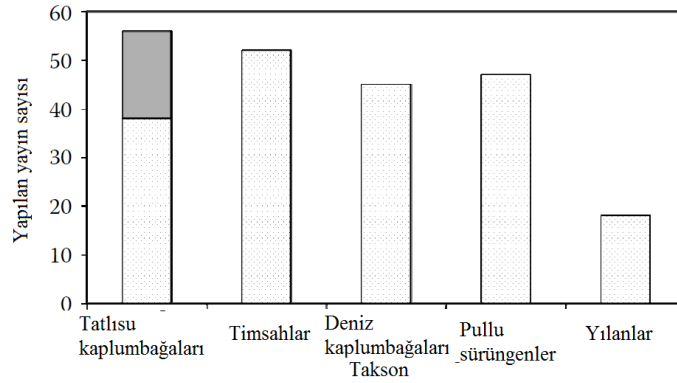
Şekil 1.8.: ISI Web of Science dan alınan verilere göre 1996 – 2008 yılları arasında amfibi ve sürüngenlerde yıllık bilimsel yayın sayıları

Sürüngenlerde kirlenici kaynaklı yapılan çalışmalara bakıldığında metaller ve endokrin bozucular öne çıkarken, organik klorlular, PCB ler ve pestisitler bunları takip eder (Şekil 1.9.).





Şekil 1.9.: Yıllara göre yapılan kirletici bazlı çalışmaların kontaminant tipine göre dağılımı



Şekil 1.10.: Yıllara göre sürüngenlerde yapılan kirletici bazlı çalışmaların taksonomik gruplara göre dağılımı

Yapılan çalışmalarda, Crocodylia takımında özellikle endokrin bozucular ve kalıcı organik kirleticiler ile ilgili çalışmalar söz konusu iken, özellikle tatlısu kaplumbağalarından *Chelydra serpentina* ve deniz kaplumbağaları ve kertenkeleler (Squamata) olarak bir sıralama yapılabilir (Şekil 1.10.) [54;58-61].

Çalışmamızda hedef olarak incelenen kara kaplumbağası (*Testudo graeca*) ile ilgili olarak 2010 yılında, kadmiyum ve kurşun gibi ağır metaller seviyelerinin, Güneydoğu İspanya ve Kuzey Afrika'daki iki farklı populasyonda, serum delta

aminolevulinik asit dehidrataz ( $\delta$  – ALAD) enzimi aktivitesine etkisini gösteren bir araştırma mevcuttur [53].

### **1.2.3. Bazı çevresel kirletici tipleri**

Pestisitlerin kemirgen, böcekler veya vejetasyona uygulanması, kazara sürüngenlere de zarar verebilir. Bununla beraber, bazen de pestisitler sıkıntı yaratan yılan, kertenkele gibi sürüngenlerin kontrolünü sağlamak için de kullanılabilir. Ayrıca sürüngen sağlığı için, özellikle parazit kontrolü için kimi zaman kullanıldığı da söylenebilir. Pestisitlerin çevreye uygulamalarıyla, sürüngenlerin maruziyeti genelde iki şekilde olur: Ya hayvan pestisit ile kontamine bir avı / besini tüketir ya da dermal veya solunum yolu ile maruz kalır [57]. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar ağırlıklı olarak kalıcı organik klorlu pestisitlerin mortalite ile ilişkili olduğuna yöneliktir. Ancak son yıllardaki çevresel kirletici etki çalışmaları hızlı metabolize olabilen organik fosfatlı bileşikler (OP) ve piretiroitler gibi kontaminantlar ve bunların subletal etkileri ve etki mekanizmalarına doğru kaymıştır. Hopkins (2002), bir değerlendirme yazısında sürüngenler üzerine ekotoksikolojik bilgi eksikliğinin bu yönde yapılacak çalışmalarla giderilebileceğini belirtmiştir. Ayrıca yaşam hikayesi özellikleri, herbivor, karnivor ve insektivor beslenen sürüngenlerin beslenme alışkanlıkları, görece uzun yaşam süreleri, bazı türlerin sınırlı hareketi, uzun süren olgunlaşma sürecinin daha da artması gibi gözlemlerin, sürüngenler üzerine yapılan kontaminant çalışmalarının potansiyel değerini artıracağını vurgulamıştır [42]. Campbell ve Campbell (2002) ise kolinesteraz inhibe edici pestisitler ve sentetik piretiroitler üzerine eksik kalan araştırma sayısına dikkat çekmişlerdir [61].

#### **1.2.3.1. Sentetik Piretiroit İnsektisitler**

Sentetik piretiroit insektisitler 1974 yılında organik klorlu insektisitlerin kullanımının kısıtlanması ve yasaklanması ile *çevre dostu* olarak sentezlenmiştir. Bu tip insektisitlerin nörotoksik etkileri sinir ve diğer uyarılabilir dokulardaki hücrelerin sodyum kanalları fonksiyonlarıyla olan karışımlar sonucunda oluşur ve tarımsal alanlarda da yoğun kullanılır [40]. En fazla bilinenleri fenvalerat, cypermetrin ve deltamethrin'dir.

Zira organik klorlu (OC) pestisitlerin kullanımının kısıtlanması ve yasaklanması, piretrin grubu pestisitlere doğru bir değişim, çevresel bozunabilirliğin de yükselmesine neden olmuştur [40].

Yaptığımız çalışmada tarım amaçlı çiftçiler tarafından kullandığını saptadığımız deltamethrin, çiftçilik ve rekreasyon alanlarında uygulanması ile böceklere karşı geniş kontrol imkanı sağlar. Deltamethrin piretroidler içerisinde en toksik kimyasal tipi olarak değerlendirilir. Toprakta 1 – 2 haftada parçalanarak, ekim yapılan alanlarda da bitkiler üzerinde 10 günden sonra kalıntı izine rastlanmayan bu kimyasal, özellikle alg patlamaları veya tozlaşmayla bağlantılı olarak arı popülasyonlarında azalmaya neden olma gibi ekolojik riskler taşımaktadır [62].

Çalışma alanında varlığı bilinen bir diğer piretroid insektisit ise cypermethrin'dir. Bu kimyasal da ilk olarak 1974 yılında sentezlenmiş olup, krizantem bitkisindeki piretrum ekstaktındaki piretrine kimyasal benzerlik gösteren sentetik bir üründür. Cypermethrin içeren piretroidler, piretrinlere nazaran daha uzun süre etkili olacak şekilde tasarlanmıştır. Güneş ışığı altında dahi kararlı olabildiklerinden, yarılanma süresi toprakta 30 güne kadar çıkabilir. Etki mekanizması deltamethrinle aynı olup, özellikle arılar için yüksek derecede toksiktirler. Omurgalı canlı gruplarına ilişkin durum değerlendirmesi yapılabilecek yeterince çalışma bulunmamaktadır [62].

### **1.2.3.2. Organik fosfatlı ve Karbamat İsektisitler Organik fosfatlı ve Karbamat İsektisitler**

#### **1.2.3.2.1. Organik fosfatlılar**

Bu pestisitler ilk olarak 1800'lerde sentezlenmiş olsa da, 1930'larda kolinerjik etkileri tanımlanarak böcek öldürücü özellikleri keşfedilmiştir [63]. Son derece zehirli olmalarına rağmen, çevrede organik klorlu pestisitlerden daha hızlı bozunurlar, akut toksisiteyi de daha yüksektir [64]. Güneş ışığı, hava ve toprak temasları ile hidrolize olarak parçalanırlar. Bu özelliklerinin yarattığı avantaj ve organoklorlu bileşiklerin kullanımının yasaklanması, kullanımını arttırmıştır. Organizmada yağ dokuda metabolitleri gözlenebilir, bu şekilde kolinesteraz enzim üzerine inhibisyon suretiyle etki gösterirler [40]. Önemli örnekleri olarak diazinon, parathion, chlorpyrifos ve malathion verilebilir.

Çalışılan alanda kullanılan chlorpyrifos, ilk olarak 1965 yılında geliştirilmiş olup, kolinesteraz inhibisyonu ile sinir sistemi üzerine etkili olduğu bilinmektedir. ABD'de 2001'den beri evlerde kullanımı, hamilelik sırasında karşılaşılan maruziyeti ile çocukların mental gelişimi üzerine etkisi olduğundan yasaklanmıştır. Tarımsal alanlarda ise Birleşik Devletler Çevresel Koruma Ajansı (EPA) nın değerlendirmesine göre, en yaygın olarak organik fosfatlı insektisitlerin kullanıldığı belirtilmektedir [65].

Çoğu pestisit gibi sucul habitatlarda yaşayan organizmalar üzerine yüksek derece toksikliği vurgulanan chlorpyrifos'un genel anlamda ekolojik etki analizi çıkarıldığında özellikle kuşlara oldukça toksiktir. Ayrıca tarımsal kullanımla birlikte, yaban hayatı ve bal arıları üzerinde da ciddi tehlike oluşturmaktadır [62;66].

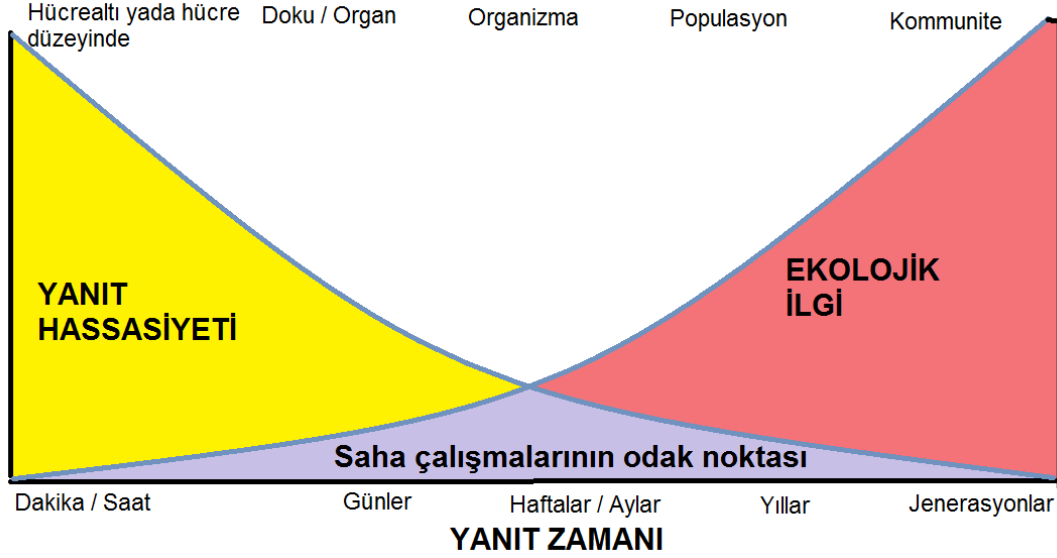
#### **1.2.3.2.2. Karbamatlar**

Karbamatlar (CB), karbamik asit ( $\text{NH}_2\text{COOH}$ ) ten türetilen organik bileşiklerdir. Bir karbamat grubu, karbamat ester ve içsel yapılaşmalarla birbirine dönüşebilen fonksiyonel grupların katkı sağladığı karbamik asitlerden oluşur. Kolinesteraz enzimlerini geri dönüşümlü olarak inhibe edebilirler. Toksik potansiyelleri, organofosforlu bileşiklere kıyasla daha düşüktür. Aldikarb, karbaril ve karbofuran başlıca karbamatlardandır.

*In vitro* olarak etkilerine bakılmış olan carbaryl, 1984'teki Bhopal felaketi ile kötü bir şöhreti olan Union Carbide şirketinin 1958 yılında sentezlediği bir pestisittir. Genelde katı, renksiz ve suda çözünür özelliklere sahiptir. Üretim sürecine bağlı olarak karbaril, ısı, sıcaklık ve asitlere karşı kararlılık gösterir [67]. Öncelikli kullanım alanı çok sayıda ticari ürün için bir insektisit olarak görülse de, sonrasında mısır, soya fasülyesi, pamuk, turunçgiller, armut gibi ürünlere de uygulanmıştır. Bununla birlikte bir mollusksit ve akarisit olarak da kullanıldığı bilinmektedir. Kuşlara görece daha az toksiktirler. Ancak tozlaşmayı sağlayan arılar ve bazı yararlı böcekler için ise ciddi sıkıntı yaratan ekolojik riskleri vardır. Laboratuvar koşullarında akut etkileri üzerine çalışılan bu kimyasalın, sahadaki kullanımı ile neden olduğu subletal etkileri gösteren çalışmalar yetersizdir [68].

#### 1.2.4. Değerlendirilen Biyobelirteçler: Enzimler, hormonlar

Genel anlamda biyobelirteçler, belirli çevresel baskıların neden oldukları, fizyolojik, biyokimyasal, immünolojik ve histopatolojik etkiler gibi çoklu toksik etkileşimlerin göstergesidirler [69].



**Şekil 1.11.:** Saha çalışmalarına odaklanmada yanıt hassasiyeti ve ekolojik ilişki. Saha çalışmaları planlanırken, zaman ve bütçenin sınırlı olması nedeniyle biyobelirteçlerden iyi verim alacak biçimde kullanılan pestisitlerle ilişkili enzimler ve üreme performansını yansıtan hormonlar değerlendirilebilir (Şekil 1.11.).

Bu yanıtlar Doku düzeyinden kommünite düzeyine kadar farklılık gösterir. Kirleticiler, biyotayı basit bir ifadeyle biyolojik organizasyonu 4 düzeyde etkileyebilir, Biyokimyasal, hücresel, birey, populasyon, kommünite şeklindedir (Şekil 1.11).

##### 1.2.4.1. Enzimler

Bir biyobelirteç olarak enzimler genelde ilk organizasyon düzeyi ile ilgili olup, bir “erken uyarı” işareti olarak değerlendirilebilir. Bu kapsamda da biyobelirteç olarak ele alınacak enzimler, esterazlar ve oksidatif stres enzimleridir.

#### 1.2.4.1.1 “B” Esterazlar

Organik fosfatlı ve karbamatlı insektisitlerin çevresel etkilerinin gösterilmesi için *kolinesteraz* inhibisyon çalışmaları, *ekotoksikolojide* en çok yararlanılan çalışmalardandır. Kolinesterazların, serum veya plazmadaki aktiviteleri üzerine yürütülen araştırmalara ek olarak beyin asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu ile mortalite arasındaki ilişki de konuyu ele alan bir başka bakış açıdır. Bu enzimin yanısıra son zamanlarda bütirilkolinesteraz (BChE) ve karboksilesteraz (CbE) pestisit kirliliğine ilişkin saha gözlem belirteci olarak yararlanılan diğer iki yaygın B – esteraz tipleridir.

Uluslararası Biyokimya Birliği'nin kabulüne göre “esterazlar”, ester bağının hidrolizi üzerine rol oynayan enzim grubudur [69]. Kendi içerisinde de, hangi tip ester bağını hidroliz ettiğine göre alt sınıflara ayrılır (Tablo 1.7.).

Tablo 1.7.: Esteraz tipleri ve organik fosfatlı (OP) bileşiklerle etkileşimi [70]

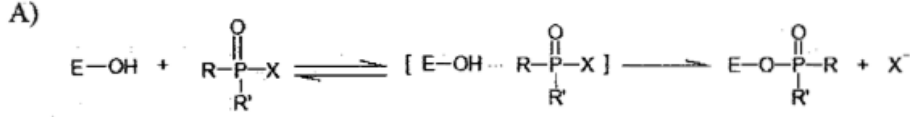
A – esterazlar	OP'ları hidrolize eder
B – esterazlar	OP'larla inhibe olur
C – esterazlar	OP'lerle hiçbir etkileşime girmezler

#### 1.2.4.1.1.1 Kolinesterazlar

Kolinesteraz (ChE) özellikleri nedeniyle, güvenilir biyobelirteçtir. Sucul omurgasızlardan, balıklara, amfibi ve sürüngenlerden kuşlara neredeyse tüm yaban hayatı risk değerlendirmelerinde OP maruziyetine duyarlılığı bakımından önde gelen biyobelirteçlerden olarak kullanılan ChE nin ekofizyolojik rolleri ancak 2000'li yıllardan sonra değerlendirilmiştir [71].

Asetilkolinesteraz [AChE (EC 3.1.1.7)]: Sinir sistemi ve nöromuskular bağlantı arasında kolinerjik sinapslar oluşturmada anahtar rol oynarlar. Presinaptik uçtaki nörotransmitter asetilkolin salınımında AChE in etkili hidrolizi ile postsinaptik hücrede kolinerjik reseptörlerin kalıcı sitümülasyonunu önler.

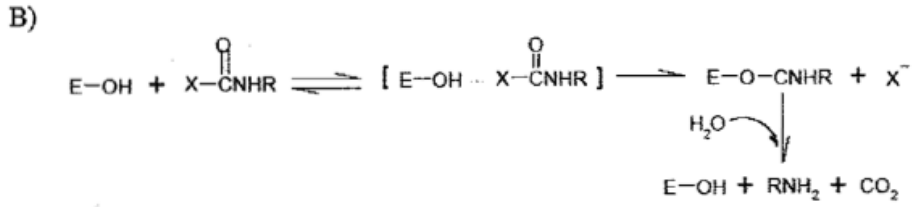
OP'ler, enzimin aktif bölgesindeki serin aminoasidinin hidroksil grubuyla reaksiyona girerek, enzim – inhibitör kompleksi oluşturur. P atomu ile X grubu arasındaki bağ zayıflayıp, bu grup ayrılır. Enzimin fosfatlanmış aşaması ise hayli karardır. P atomunun dahil olduğu gruplara bağlıdır.



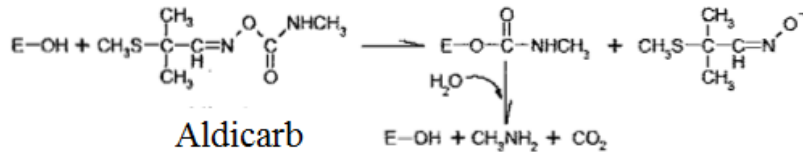
Örneğin



Parathion



Örneğin



Şekil 1.12.:Asetilkolinesteraz (E-OH) inhibisyon mekanizmaları:

A) organik fosfatlı pestisitler B) karbamat pestisitler

Bu tip bir inhibisyon geri dönüşümsüzdür. Eğer dealkilasyon yapılır veya fosfat kısmındaki bir alkil grup (R veya R') uzaklaştırılırsa, enzim aktivitesi geri döndürülemez. Bu aşama “aging” olarak tanımlanır ve oksimler gibi reaktivasyon ajanları kullanılsa dahi, enzim yeniden aktivitesini gösteremez. AChE ler üzerinde CB'ler de, OP'lere benzer biçimde bir inhibitörik etki gösterir, ancak karbamile olmuş enzimler H<sub>2</sub>O gibi nükleofilik moleküllerin varlığında geri dönüşebilirler (Şekil 1.12.) [72].

Bütirikolinesteraz [BChE (EC 3.1.1.8)] : Sıklıkla spesifik olmayan esteraz veya psödokolinesteraz olarak tanımlanır. Bütirikolin, asetilkolin, propionilkolin ve benzoilkolin gibi kolinesterler ile hidrolize olurlar. Bu enzim, hayvanlar aleminde,

özellikle çoğu omurgalı olan türlerin kanında bolca bulunur. BChE nin OP veya CB lı bileşiklerle inhibisyonu, AChE ninkine benzer. Ancak enzimolojik bakış açısından değerlendirildiğinde substrat tercihleri ve spesifik inhibitörlerinin farklı olduğu görülür (Tablo 1.8.):

Tablo 1.8.: AChE ve BChE nin birbirinden ayrılan enzimolojik özellikleri [69]

Kolinesteraz	Substrat özgüllüğü	Seçici inhibitörü
AChE	Tercihen AcSCh i hidroliz eder, BuSCh i ayıramaz.	BW284C51 ve GD-42
BChE	BuSCh i diğer kolinesterlerden daha yüksek oranda hidroliz eder.	Iso-OMPA, DFP ve etnopropazin

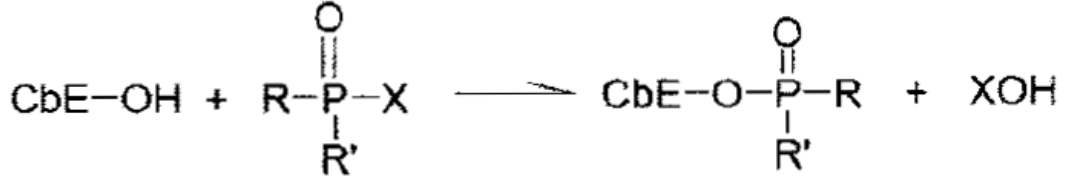
BChE in çok sayıda biyolojik fonksiyonda rol aldığı söylenebilir. BChE nın bu özelliği, hedef olmayan belli organizmalardaki toleransı ile OP zehirlenmelerindeki rolünü açıklamaya yardımcı olur [73].

#### 1.2.4.1.1.2 Karboksilesterazlar

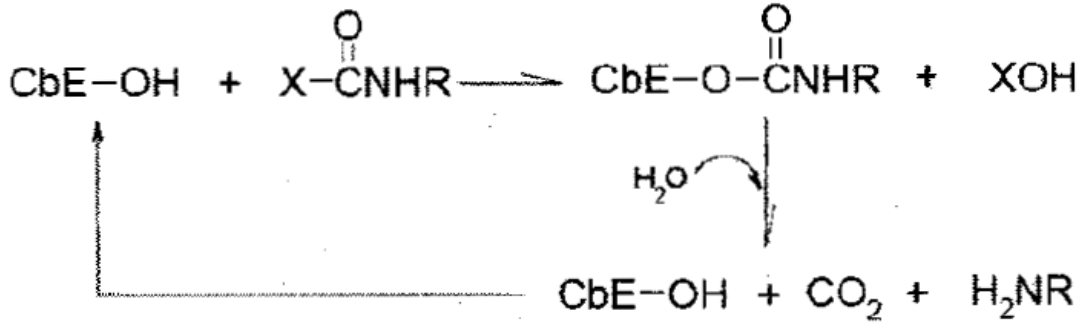
Karboksilesteraz [CbE (EC 3.1.1.1)]: Bu grup B – esterazları, karboksilik asit esterlerini su eklenmesiyle hidroliz edebilirler (Şekil 1.16.) [74]. Karbamile olan CbE kendiliğinden reaktif olabilirken, fosfatlanmış CbE geri dönüşümsüz inhibisyona maruz kalır. CbE lar akciğer, karaciğer, ince bağırsak, kalp, böbrek, kas, beyin, testis, yağ doku, lökositler ve kanda bulunurlar [75]. Karboksilesterazların doku ve organizmaya göre çok sayıda izozimleri bulunabilir [76]. Karboksilesterazlar, pestisit detoksifikasyonuna iki biçimde katılırlar: *i)* ester bağlarını (CB lar, piretiroidler) hidroliz ederek, *ii)* CbE ye OP veya CB lerin bağlanmasıyla (inhibisyon) [69].



A)



B)



Şekil 1.13.: Karboksilesteraz inhibisyon (CbE – OH) mekanizmaları  
A) Organofosfatlı Pestisit ile B) Karbamat ile

Böceklerden memelilere değin çok farklı özelliklerde canlı grubu üzerine yapılan çalışmaya rağmen, tarımsal kimyasallara maruziyet ile CbE aktivitesi arasındaki ilişkide yine de amfibi ve sürüngenler gibi grupların da değerlendirilmesi ile ekosistem düzeyinde çevresel gözlem çalışmalarının yararlı olabileceği araştırmacılar tarafından da vurgulanmaktadır. Bir önemli avantaj da serum CbE aktivitesinin biyobelirteç olarak değerlendirilebilmesi, beyin AChE aktivitesine kıyasla hayvanın hayatını riske atmayan bir test tipidir [75].

#### 1.2.4.1.2 Oksidatif Stres (OS) Enzimleri

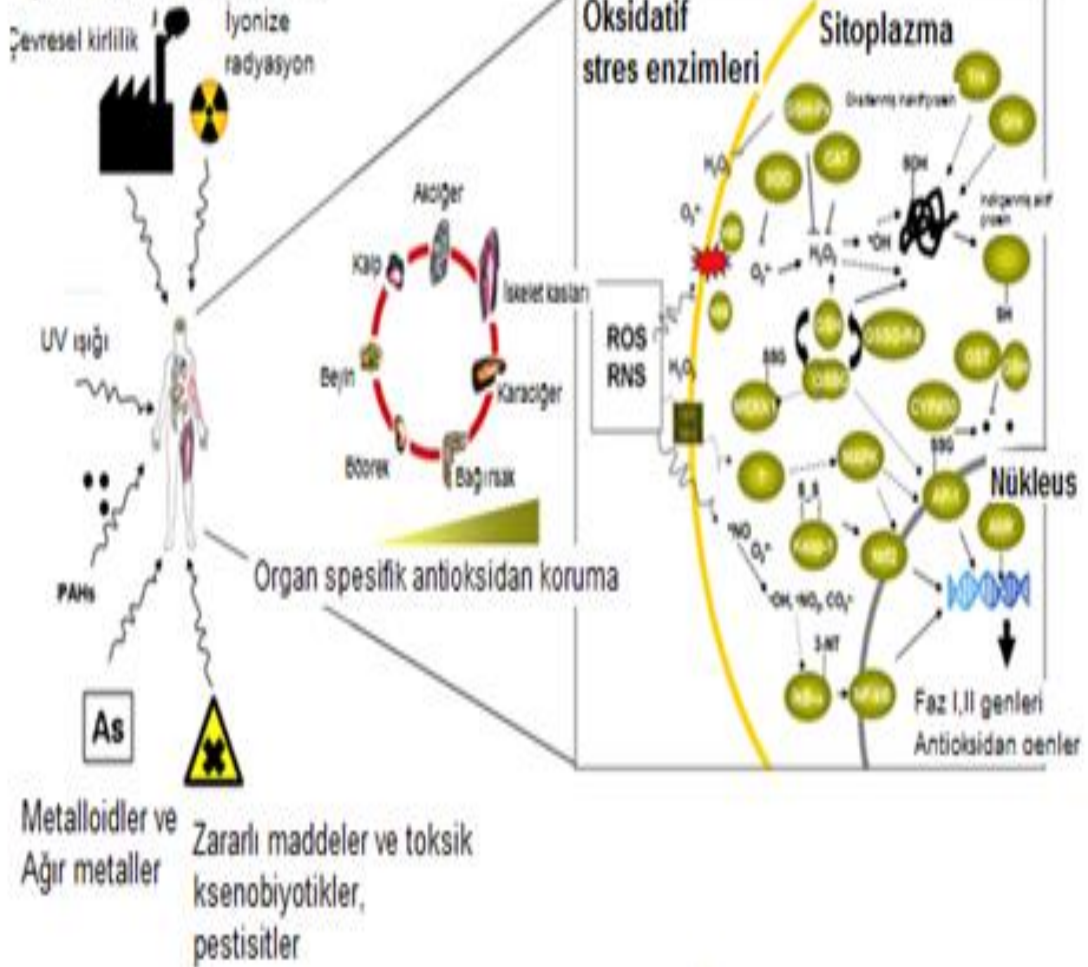
Aerobik organizmalarda oksijen, etkili enerji üretimi için gerekli olsa da, paradoksal olarak hücrelerde kronik toksik stresi de üretir. Oksidatif stres (OS), toksik grupları uzaklaştırmak için hücrel antioksidant savunma kapasitesinin aşırıya kaçmasıyla Reaktif Oksijen Türleri (ROT) üretimi ile sonuçlanır [77]. Bir diğer deyişle, oksidatif stres serbest radikal üretimi ile vücut antioksidan savunma

sistemi arasındaki dengesizliktir [78]. Doku ve organların birbirinden farklı oranlarda metabolik aktiviteleri ve oksijen tüketimleri mevcuttur. Dolayısıyla antioksidan seviyeleri de birbirlerinden farklıdır [79].

Hayvanlarda ROT nin neden olduğu hasarlara karşı geliştirilen çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Antioksidan kapasite iki ana sistemde değerlendirilir: Bunlar katalaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve Glutatyon-S–transferaz (GST) gibi enzimatik sistemler ve glutatyonun (GSH) indigenmiş formu, aminoasitler ve vitaminler gibi enzimatik olmayan antioksidatif sistemlerdir [80].

Organik fosfatlı insektisitler, kolinesteraz inhibisyonu ve kolinerjik etkilerin varlığının dışında çeşitli araştırmacılar tarafından OP toksisitesinin yan etkileri olarak oksidatif stresin hem insanlarda hem hayvanlarda rapor edilmiştir [80].

## Oksidatif hasarla ilişkili Çevresel Faktörler



Şekil 1.14.: Oksidatif hasar ile ilişkili çevresel faktörler ve oksidatif stres yanıtları [80]

Oksidatif stresi ölçmek için çok sayıda farklı biyobelirteçler ve teknikler bulunmasına rağmen, hiçbir biyobelirteç tek başına doğru değerlendirme için ideal biyobelirteç olmayabilir [81]. Bu nedenle, farklı türlerle daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır (Şekil 1.14) [80].

### 1.2.4.1.2.1. Glutasyon S – transferaz enzimi

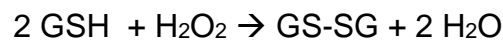
Glutasyon S – Transferaz [GST (EC: 2.5.1.8)]: Eskiden “ligandinler” olarak bilinen bu Faz II metabolik izozim ailesi, Glutasyon’un (GSH) indirgenmiş formunun, ksenobiyotik substratlar ile bağlantısını katalizleyip, detoksifikasyonda rol

oynamasıyla tanınır. GST ailesi, sitosolik, mitokondriyal ve mikrozomal olmak üzere üç süperaileden oluşur [82]. Mikroorganizmalardan memelilere kadar çok geniş düzeyde etkinlikleri bildirilen GST, organizma içinde de özellikle karaciğer başta olmak üzere, bağırsaklarda, böbreklerde, kas, dalak, testis ve plasenta gibi birçok doku hücrelerinin sitosolü ve membranında bulunmaktadır [83]. GST, çevre kirleticilerinden ilaçlara, karsinojenlerden pestisitlere kadar birçok bileşiği metabolize edebilirler. Ayrıca prostoglandinlerin izomerizasyonu, hem, bilirubin, safra tuzları ve yağ asitleri gibi nonsubstrat ligandları GSH ile bağlayarak taşınmasını da sağlar.

Çeşitli GST izozimleri de hücre proliferasyonu ve ölümünü düzenleyen MAPK (Mitojenik Aktif Edilmiş Protein Kinaz) metabolik yolunda, kinazın işlevini inhibe ederek, kinazın sinyal veren basamaklarını kolaylaştırmasına yardımcı olur [84]. Bunun dışında, yüksek seviyede serum  $\alpha$ GST'nin (*nefro*)toksikite, iskemi veya viral enfeksiyonlar için de belirteç olarak değerlendirilebileceği rapor edilmiştir [85;86].

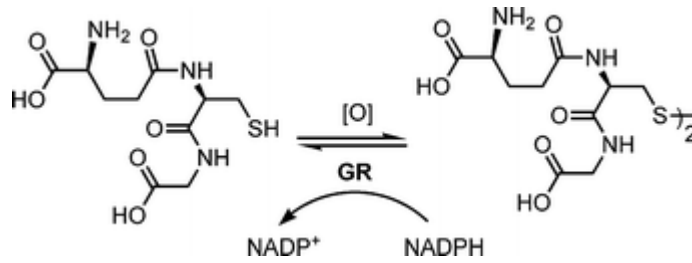
#### **1.2.4.1.2.2. Glutasyon peroksidaz enzimi**

Glutasyon Peroksidaz [GPx (EC: 1.11.1.9)]: Glutasyon peroksidaz (GPx), 1957 yılında Gordon Mills tarafından keşfedilmiştir [87]. Biyolojik rolü, peroksidaz aktivitesiyle organizmanın oksidatif hasardan korunması olan enzim ailesinin genel adıdır. GPx'in biyokimyasal işlevi ise alkol ile ilişkili lipid hidroperoksitlerini ve serbest hidrojen peroksiti ( $H_2O_2$ ) suya ( $H_2O$ ) indirgemektir. GPx'in bugüne değin gastrointestinal bölgeden epididimal androjen ilişkili proteine, plazmadan fosfolipit hidroksiperoksidaza 8 farklı izoformu tanımlanmıştır. Yaş ile ilgili olarak da GPx aktivitesi üzerinde, özellikle canlı gruplarının erginlerinde yapılacak çalışmalar, organizmanın yaşam döngüsünde oksidatif stresin durumundaki belirsizlikleri azaltmaya yardımcı olacaktır [88]. GPx' in katalizlediği ana reaksiyon şöyle gösterilebilir:



### 1.2.4.1.2.3. Glutasyon redüktaz enzimi

Glutasyon redüktaz [GR (EC 1.8.1.7)]: Glutasyon disülfid (GSSG) i önemli bir hücrese antioksidan olan GSH in sülfhidril formuna indirgeyen bir enzimdir (Şekil 1.15.). Bu enzim, bakteri ve mayalardan, hayvanlara bütün canlı alemlerinde korunmuştur. Ancak bitkilerde iki GR geni ile kodlanıp, Drosophila ve Trypanosoma da herhangi bir GR olmaması bir bakıma bu enzimi ilginç hale getirmiştir [89]. Yüksek seviyede oksidatif strese maruz hücrelerde glukoz tüketimi artar, bu durum pentoz – fosfat metabolik yolu ile ilişkilendirilebilir. Çünkü bu reaksiyon için NADPH üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Eğer Pentoz – Fosfat Metabolik yolu işlevsiz olursa, hücredeki oksidatif stres toksik etkiye neden olur [90].



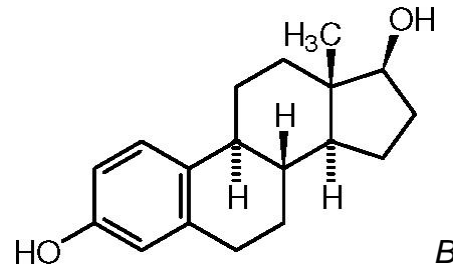
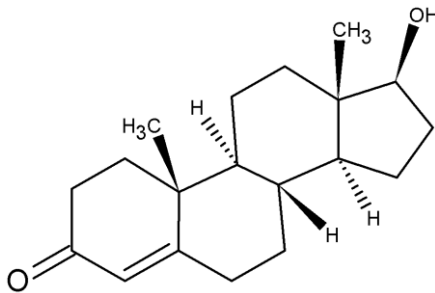
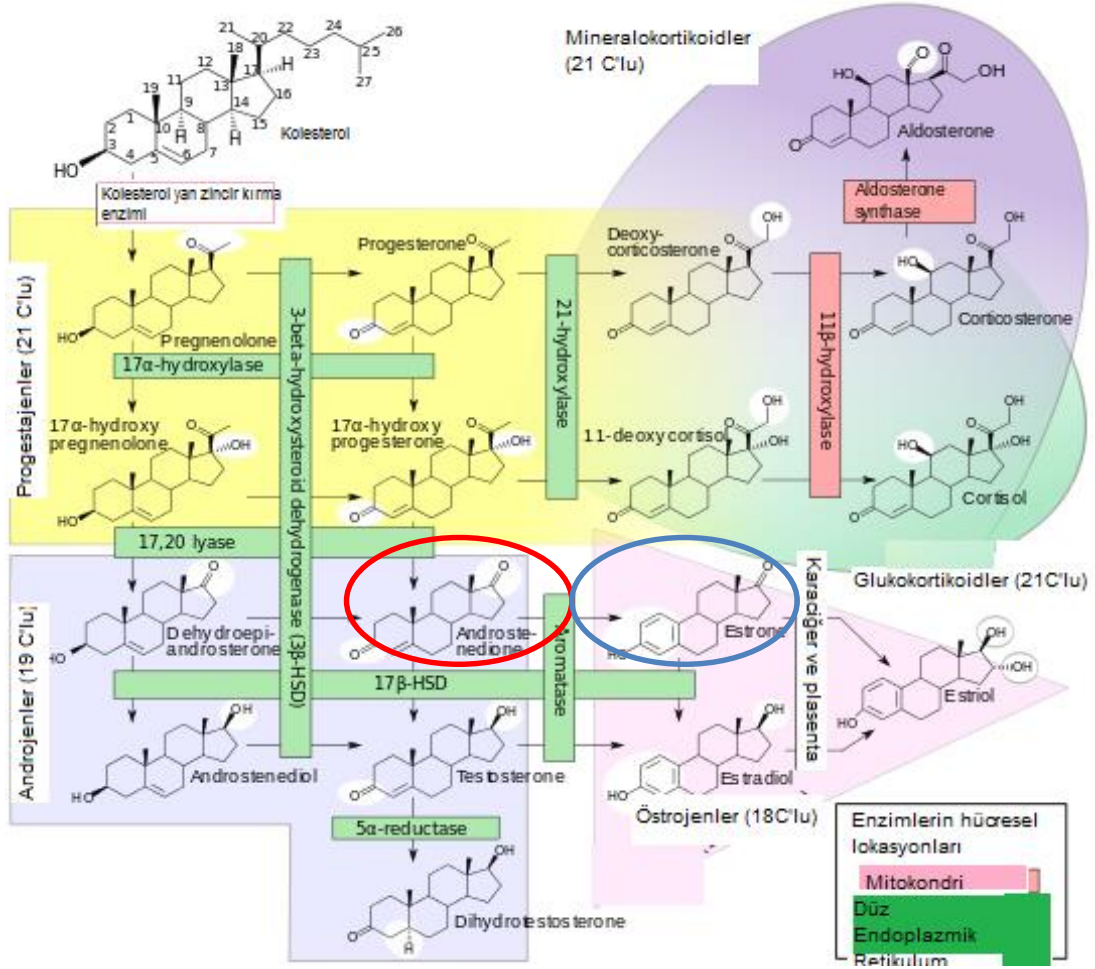
Şekil 1.15.: Glutasyon Redüktaz ile okside glutasyon indirgenir, NADPH ise NADP<sup>+</sup> ya yükseltgenir.

### 1.2.4.2. Hormonlar

Bu çalışma kapsamında erkek bireyler için testosteron (T) ve dişi bireyler için estradiol (E<sub>2</sub>) eşey hormonları değerlendirilmiştir. Bu hormonlar, üremeye ilişkili olmaları bakımından, incelenen alanların özelliklerine göre populasyonun üreme başarısı hakkında fikir edinmeyi de sağlarlar.

#### 1.2.4.2.1. Testosteron (T)

Testosteron, androjen grubundan bir steroid hormon olup, erkeklerde testislerde üretilir. Erkeklerde sadece testis gibi üreme sistemi dokularının gelişiminde rol almayıp, kas, kemik kütlesi ve genel anlamda sağlık için de önemli işlevler görmektedir. Dolayısıyla T'nin yalnız androjenik değil, aynı zamanda anabolik etkileri de vardır. Aşağıdaki şekilde organizmaların izledikleri steroidogenez mekanizmaları verilmektedir (Şekil 1.16.). Testosteronun bu özelliği ile hayatta kalabilme için sorun çözme gibi etkinliklerde de rol oynadığı araştırmacılar tarafından öne sürülmüştür [91].



Şekil 1.16.: Steroidogenez: bir Testosteron molekülü (A) ve bir Estradiol molekülü (B)

Bu hormonun, *ekotoksikolojik* açıdan önemi Chlorpyrifos'lu pestisitlere maruziyet ile testosteron seviyesindeki düşüş arasında bir korelasyon olduğudur. Bu durum bir Chlorpyrifos metaboliti olan TCPY ile testosteron konsantrasyonu arasındaki ters ilişkili çoklu lineer regresyon modeli ile gösterildiği gibi, karbaril ve naftil eter ile de saptanmıştır [92]. Yani organizma ne kadar fazla bu tiplerde pestisite maruz kalırsa, o kadar düşük düzeyde testosteron seviyesine sahiptir.

#### **1.2.4.2.2. Estradiol (E<sub>2</sub>)**

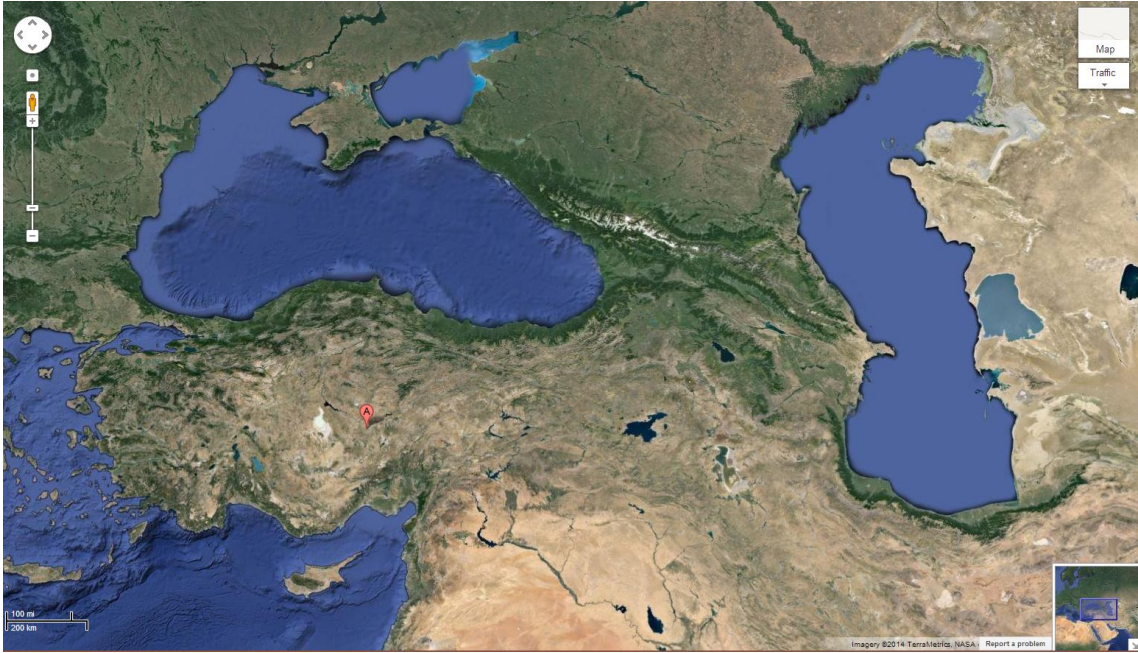
Dişilerin ovaryumlarından salgılanan steroid yapıdaki hormonlardan biri de estradiol (E<sub>2</sub>) dir. E<sub>2</sub>, moleküler yapısındaki iki hidroksil grubundan kaynaklanan bir kısaltmadır. Plazmada çoğunlukla eşey hormonu bağlayıcı globülin ve albümine bağlanmıştır. Üreme ile ilgili fonksiyonlarının yanısıra kemikleri etkileyip, yağ depolanmasında oynadığı roller de vardır. Bununla beraber, karaciğerdeki lipoproteinlere etkisi ve beyinde nöronkoruyucu işlevi ile antioksidan olarak araştırmacılar tarafından önerilmektedir [93].

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Çalışma alanları

Çalışma alanı Kapadokya bölgesinde Nevşehir il merkezi sınırları içerisinde yer alan Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisidir (Şekil 2.1.). Karasal-yarı kurak iklimin etkili olduğu bu bölgede, genel olarak yaz aylarının sıcak ve kurak, kış aylarının ise sert, soğuk ve yağışlı geçtiği söylenebilir. Kış aylarında yükselen nisbi nem miktarı, geç yaz dönemlerinde düşer. Hava sıcaklığı ise  $-28^{\circ}\text{C}$  ile  $+40^{\circ}\text{C}$  arasında seyreder.

Bölgede baskın olan toprak profili Orta Anadolu jeolojisi içerisinde kendine özgü bir yapı halini almıştır. Yani kumlu-tüflü toprak, volkanik kum, kül (volkanik tüfler) ve volkanik kökenli olmayan kumlar üzerinde bulunur. Su tutma kapasitesi çok düşük olan bu toprak, bu nedenden dolayı organik madde, kireç ve kil bakımından da yeterli değildir. Zaten, ince bir üst horizonun hemen altında anakaya bulunmaktadır.



Şekil 2.1. Çalışma alanlarının Türkiye'deki yerinin gösterimi (A:Nevşehir) [94]

Kaplumbağa Vadisi, yerleşim alanlarına uzak, vejetasyonun oldukça zayıf olduğu, herhangi bir tarımsal faaliyetinin yürütülmediği bir bölgedir. Hayvan çiftliklerinin bulunduğu bu bölgede, yakın geçmişte çalışma izni verilen kum ocakları da bu bölgeyi yaşam alanları olarak kullanan canlılar için habitat kaybına da neden olmuş olabilir. Her ne kadar zayıf bir vejetasyona sahip diye ifade edilse



de, bu biçimde de küçükbaş hayvanların otlatıldığı bir mera olarak da değerlendirilebilmektedir. Zaten Kaplumbağa Vadisi'nde bulunan bitkiler olarak *Alyssum* sp. (Brassicaceae), *Bromus* sp.(Poaceae), *Astragalus* sp (Fabaceae), *Prunus armeniaca*, *Rosa canina* (çeşitli varyeteleri), *Crataegus* sp., *Pyracantha* sp. (Rosaceae), *Anthemis* sp., *Matricaria* sp. (Asteraceae), *Bromus* (Poaceae), *Ranunculus* sp. (Ranunculaceae), *Salsola* sp. (Amaranthaceae) ve *Alkanna* sp. (Boraginaceae) dir. Kaplumbağa Vadisi'nin genel görüntüsü Şekil 2.2.a.'da gösterilmektedir. Kaplumbağa Vadisi'nde bu çalışmanın konusu olan *Testudo graeca* nın yanısıra *Natrix natrix*, *Lacerta viridis*, *Lacerta cappadocica* ve *Ophisops elegans* türü sürüngenlere ve *Vulpes vulpes* ve *Martes* sp. türü memeliler de bulunmaktadır. Kaplumbağa Vadisi içerisinde kara kaplumbağalarının yakalandığı alan, 38.634°-38.6345° ile 38.6397°-38.64° Kuzey enlemleri ve 34.7225°-34.7191° ile 34.7237°-34.723° Doğu boylamları arasında yer alan 20.93 ha'lık bir alandır (Şekil 2.2.b.) fakat kara kaplumbağalarının yaklaşık 1,5 ha'lık bir alanda yoğunlaştıkları gözlenmiştir.



Şekil 2.2.a. Kaplumbağa Vadisi'nin genel görüntüsü



Şekil 2.2.b. Kaplumbağa Vadisi'nde kara kaplumbağalarının izlendiği alan.

Nar Vadisi ise, Nar Beldesi içerisinde yer alan, bahçe tarımının yapıldığı antropojenik etkenlere açık bir alandır. Dolayısıyla Nar Vadisi'nde bulunan bitkiler doğal olarak bulunabildikleri gibi tarım amaçlı olarak da varlıkları alanın tür kompozisyonunu oluşturmaktadır. Bu bitkiler, *Anthemis* sp., *Matricaria* sp., ve *Lactuca* sp. (Asteraceae), *Amygdalus* sp., *Pyracantha* sp. (Rosaceae), *Astragalus* sp., *Colutea cilicia*, *Trifolium*, *Malus* sp. (Fabaceae), *Salvia recognita* (Lamiaceae), *Chenopodium* sp. (Chenopodiaceae), *Scrophularia* (Scrophulariaceae), *Alyssum* sp. (Brassicaceae) *Bromus* (Poaceae) ve *Euphorbia* (Euphorbiaceae), *Onosma* (Boraginaceae), *Tilia* (Tiliaceae), *Solanum* sp. ve *Capsicum* sp. (Solanaceae), *Petroselinum* sp. (Apiaceae), *Eleagnus* (Elaeagnaceae), *Vitis* sp. (Vitaceae) ve *Juglans* sp. (Juglandaceae)'dir. Nar Vadisi'nin genel görüntüsü Şekil 2.3.a.'da gösterilmektedir.

Tarımsal faaliyetlerin yoğun olarak yürütüldüğü bu alanda *Lacerta viridis* türü kertenkelelere sıklıkla rastlanmıştır. Ancak Nar Vadisi içerisinde kara kaplumbağalarının tespit edildikleri bölge, 38.647°-38.6471° ile 38.648°-38.6477° Kuzey enlemleri ve 34.7121°-34.7124° ile 34.7108°-34.711° Doğu boylamları arasında yer alan 0.93 ha'lık bir alan olarak tespit edilmiştir (Şekil 2.3.b.).



Şekil 2.3.a. Nar Vadisi'nin genel görüntüsü.



Şekil 2.3.b. Nar Vadisi'nde kara kaplumbağalarının izlendiği alan.

Saha çalışmaları kara kaplumbağalarının aktif oldukları Nisan – Ekim 2012 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Saha çalışması 22 Nisan 2012 tarihinde başlamış olup; sonrasında takip eden her ayın 3. haftası Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'ne gidilerek mevsimsel koşulların el verdiği ölçüde örneklem elde edilmeye çalışılmıştır. Sadece Ağustos ayında, dinlenme oyuklarında varlıkları tespit edilen kara kaplumbağalara, biyolojik ritimleri etkilenmesin diye hayvanlara dokunulmamıştır. Her saha çalışmasına gidildiğinde her iki alan da taranmıştır. Böylece aylara ve alanlara göre değişim gösteren veriler dizisi oluşturulmaya çalışılmıştır. 2012 yılı içerisinde elde edilen bu veriler ile canlıların aktivite gösterdiği bu periyotta hibernasyondan çıkış, besin temin etme, üreme dönemi,

estivasyon hazırlıkları gibi kara kaplumbağaları için hayati önem arz eden durumlarına ilişkin bir profil hazırlanmıştır.

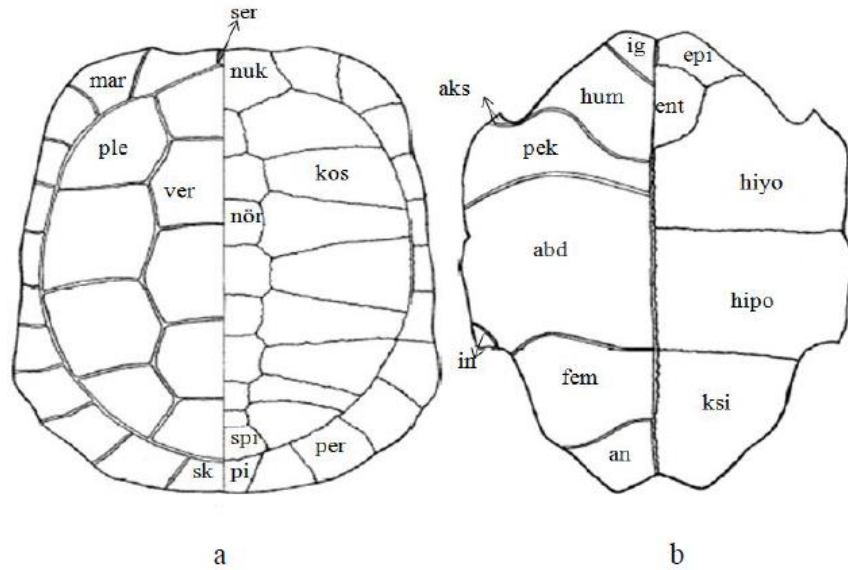
Çalışma saat 07:30-11:30 ve 14:30-18:30 arasında gerçekleştirilerek, sabah ve öğleden sonra diye iki kısma ayrılmış Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde geçirilen zaman eşitlenmiştir.

### 2.1.1. Aktivite dönemlerinin değerlendirilmesi

Kapalı populasyonlarda ve kısa dönem çalışmalarda kullanılan populasyon yakalama yöntemi ile tespit edilmiştir.

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı Nisan – Ekim ayları arasında yürütülen saha çalışmaları sırasında yakalanan bireyler kabuk üzerinde yapılan işaretler ile kimliklendirilip, serbest bırakılmıştır.

Kara kaplumbağalarında kaynaşmış dermal kemiksi elementlerle oluşan dorsalde karapas, ventralde plastron ve lateral köprüden oluşan bir kabuk yapısı vardır. Ayrıca epidermal kökenli keratin pullar bulundurulur [95] (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Kara kaplumbağası kabuğunun boynuzumsu (sol) ve kemiksi (sağ) elementleri [95]:

[**a-karapas**; ser:servikal plak; mar: marjinal plak; ver: vertebral plak; ple: pleural plak; sk:suprakaudal plak; nu: nukal kemik; nör: nöral kemik; kos: kostal kemik; spi: suprapigal kemik; pi: pigal kemik; per: periferel kemik,

**b-plastron**; ig: intergular plak; hum: humeral plak; pek: pektoral plak; abd: abdominal plak; fem: femoral plak; an: anal plak; aks: aksilar plak; in: inguinal plak; epi: epiplastron; ent: entoplastron; hiyo: hiyoplastron; hipo: hipoplastron; ksi: ksifiplastron.]

İşaretleme, silinmeyen ve sudan etkilenmeyen kalemle karapasın belirli noktalarına numaralar verilerek yapılmıştır fakat bu yöntemin yetersiz olduğu gözlemlendiğinden bireyler şarjlı matkaplar yardımıyla karapaslarındaki marjinal pullar delinerek işaretlenmiş ve numaralandırılmıştır (Şekil 2.5.). Bireylere ait morfolojik ölçümler, gözlemlendiğindeki davranışı, alınan kan örneği miktarı, parazit varlığı, malformasyonlar, alan bilgileri gibi veriler için bir arazi formu oluşturulmuştur (Tablo 2.1.).



Şekil 2.5. Karapastaki marjinal plakları delinerek işaretlenmiş bireyler

Bu sayede kondisyon faktörünün hesaplanabilmesi için yakalanan ve işaretlenen bireylerin Düz Karapas Boyu (DKB), Eğri Karapas Boyu (EKB), Karapas Yüksekliği (KY) ve Plastron Uzunluğu (PU) ölçülmüştür.

Tablo 2.1.: Kara Kaplumbağası Saha Çalışması Veri Formu

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ KARA KAPLUMBAĞA ARAZI FORMU									
BİREY									
Etiketi		Juvenil/ Ergin		Esey		Bulunduğu alan		Tarih	
		Beslenme		Kur		Durağan		Aktif	
		Gözlemlendiğindeki davranışı						Diğer	
Morfolojik ölçümler									
Uzunluklar (mm)								Ağırlık (g)	
DKB		KY		GSU		ASU			
DKE		PU		HSU		SG1			
MEN		PG1		PSU		SG2			
NU		PG2		AbSU		SU			
NG		PG3							
				Alınan miktarlar			Kene durumu		
				Serum		Plasma		(varsa neresinde kaç tane?)	
Kondisyon faktörü (100xbwxb)				Kan Örneği					
				Malformasyonlar					
Üye uzunlukları*				Karapas					
Ön Sol		Arka Sol		Plastron					
Ön Sağ		Arka Sağ		Üyeler					
ALAN									
Koordinatlar						Rakım		Bakı	
Meteorolojik bilgiler		Sıcaklık		Nem					
Herhangi bir belirin dış tehdit									
Bölgeye hakim vejetasyon yapısı									

Ayrıca bireylerin ağırlıkları tartılarak, forma kaydedilmiştir. Böylece bu morfolojik parametreleri ile bireylerin kondisyon faktörleri çıkarılmıştır. Kondisyon faktör indeksi vücut ağırlığı ile düz karapas uzunluğu arasındaki regresyona göre elde edilen bir değerdir. Bagenal ve Tesch (1978) 'ten modifiye edilerek oluşturulan kondisyon faktörü denklemi aşağıda verilmiştir:

$$Kondisyon\ faktörü = \frac{100 \times Vücut\ ağırlığı\ (g)}{Karapas\ uzunluğu\ (mm)^3} \quad [96]$$

Yakalanan bireylerin cinsiyetleri *Testudinae* için kullanılan kritik karakterler yardımıyla belirlenmiştir.

Düz Karapas Boyu uzunluğu minimum 100 mm olan bireyler eşeyssel olgunluğa ulaşmış olarak kabul edilir ve 100 mm düz karapas boyu, cinsiyete karar verebilmek için gerekli olan minimum büyüklükten daha fazladır. Genellikle 6 yaşından büyük bireylerde cinsiyet tespit edilebilir. 6 yaşından küçük bireylerin olgun olmadığı farz edilir ve juvenil olarak sınıflandırılır [20]. Zaten bu çalışmada erişkin bireyler üzerinden yürütülmüştür. Hiçbir juvenil birey örneklem grubuna katılmamıştır.

*Testudo* alttürlerinin doğal diyetleri beslenme davranışının direkt gözlenmesi suretiyle [23] ve dışkı analizi ile [6] tespit edilmiştir.

Direk gözlem yaklaşımı, aktiviteleri ve beslenme davranışları süreklilik arz etmeyen Testudo türleri için kimi zaman etkili görülmesi de [97;98], alanlarında serbest dağılan bireylerin besin tercihlerini belirlemede yararlı neticeler gösteren bir metottur [98].

Diğer bir yaklaşım olan dışkı analizi yöntemi ise genel bir yaklaşımla herbivor canlıların besin tercihini belirlemede sıklıkla yararlanılan, indirekt bir metottur [21]. Bitki türlerinin sindirilme oranlarının birbirine benzeşmemesi, bu yöntem ile diyet içeriğini değerlendirmede pek etkili olmayabilir [99]. Ancak bu sayede beslenme biçiminin herbivor olup olmadığı rahatlıkla söylenebilir [56].

Örneğin yaptığımız bu çalışmada da dışkılarından elde edilen meyve çekirdekleri, sonrasında alanda bulunan meyvelerin çekirdekleri ile karşılaştırılmış, bu sayede kara kaplumbağalarının besin tercihleri ortaya çıkarılmıştır.

2012 yılının Nisan – Ekim ayları arasında yapılan saha çalışmaları sırasında Falcon tüpler ile elde edilen dışkı örneklerinden daha sonradan makroskopik ve mikroskopik inceleme ile gastro – intestinal parazitik nematodlar kaydedilmiştir. Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde yakalanan dişi ve erkek kara kaplumbağalarının üzerinde bulunan keneler bir pens yardımıyla toplanarak %70'lik etanol içerisinde alınmıştır. Keneli bireylerin cinsiyetleri, yaş grupları ve kenelerin tutunduğu bölgeler arazi formuna kaydedilmiş olup, tür teşhisleri de sonradan yapılmıştır.

Bu şekilde tespit edilen iç ya da dış parazitler etkiler, çalışılan enzimatik / hormonal aktivitelerle ilişkili olup olmadığını değerlendirme için kullanılmıştır.

Kara kaplumbağaları, Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı Nisan ayında hibernasyondan çıkış döneminde, Ekim ayında ise hibernasyona giriş dönemlerinde izlenmiştir. Hibernasyon döneminde kullanılan hibernakulumlar belirlenmiştir.

Hibernakulum iç sıcaklıkları ilkbahar dönemi hibernasyondan çıkış ve sonbahar dönemi hibernasyona giriş aşamasında dijital termometre ile kaydedilmiştir.

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı içerisinde kara kaplumbağalarının hibernasyon dönemleri böylece belirlenmiş ve mevsimsel parametrelerle ilişkisi ortaya konmuştur.

Bunun yanısıra Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı Mayıs-Eylül ayları arasında da kara kaplumbağalarının estivasyon dönemleri de takip edilmiştir. Estivasyon döneminde kullanılan estivasyon oyukları tespit edilerek bu oyukların iç sıcaklıkları tıpkı hibernasyon bilgileri gibi kayıt altına alınmıştır.

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 içerisinde kara kaplumbağalarının hibernasyon dönemleri de böylelikle belirlenmiş ve mevsimsel parametrelerle ilişkisi ortaya konmuştur.

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılında hibernasyon dönemi sonlanırken, hibernasyon dönemine girilirken ve estivasyon süresi içerisinde bireyler takip edilmiş, izlenen bireylerin cinsiyetleri, gözlem anındaki aktivite biçimi kaydedilerek aylara göre cinsiyetler arasındaki aktivite dönemleri farklılıkları da belirlenmiştir.

### **2.1.2. Üreme dönemlerinin değerlendirilmesi**

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılında ilkbahar ve sonbahar üreme dönemleri içerisinde gözlenmek suretiyle çiftleşme dönemleri tespit edilmiştir. Bu çiftleşme dönemlerinin mevsimsel parametrelerle ilişkisi değerlendirilmiştir. Şayet bir çiftleşme davranışı gözlenirse, bu davranışı yaparken sergiledikleri hareketlerin kaydı tutulmuş, birleşme tamamlandıktan sonra söz konusu bireylerden örneklem sağlanmıştır.

### **2.1.3. Tarımsal alanda varlığı bilinen insektisitler ve zamana göre kullanımları**

Çalışma alanı olarak belirlenen alanlardan, daha önce ifade edildiği gibi sadece Nar Vadisi tarımsal faaliyetlerin yürütülebildiği tarlalara yakınlık göstermektedir. Yerel halk da yetiştirdikleri sebze ve meyvelerin tarımsal ürün zararlısı böceklerden kaynaklanan verim kaybını önlemek için organik fosfatlı bileşikler ve sentetik piretroid bazlı çeşitli pestisitler kullanmaktadır. Bu kimyasallar ağırlıklı deltamethrin ve chloropyrifos insektisitleridir. Tablo 2.2. araştırma alanında 2012 yılında kullanılan pestisitler ile kullanıldığı bitki ve hastalığı, Nevşehir Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü yetkililerinden alınan bilgiler ve Nar Beldesi çiftçileriyle görüşülerek hazırlanmıştır:



Tablo 2.2.: Nar Vadisi'nde varlığı bilinen insektisitler ve zamana göre kullanımları

<b>NAR KASABASINDA YOĞUN ÜRETİMİ YAPILAN BİTKİSEL ÜRÜNLER</b>				
<b>SIRA NO</b>	<b>ÜRÜN ADI</b>	<b>HASTALIK ADI</b>	<b>İLACIN ETKEN MADDESİ</b>	<b>İLAÇLAMA DÖNEMİ</b>
1	CEVİZ	ANTROKNOZ	MANEP % 80 , % 50 BAKIR OKSİKLORÜR	01-15 MAYIS, 01/15 HAZİRAN
		İÇ KURDU	DELTAMETHRIN/ 25 GR, CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	01-15 HAZİRAN, 15 -30 HAZİRAN
2	ÜZÜM	KÜLLEME	KÜKÜRT	10 NİSAN,25 NİSAN,20 MAYIS
		SALKIM GÜVESİ	DELTAMETHRIN/ 25 GR, CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	25 NİSAN, 20 HAZİRAN
3	ELMA	İÇ KURDU	DELTAMETHRIN/ 25 GR, CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	1-15 MAYIS, 20- 30 MAYIS
		KARALEKE	MANEP % 80 , % 50 BAKIR OKSİKLORÜR	01-15 MAYIS, 01/15 HAZİRAN
		YAPRAK BİTİ	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	15 -30 MAYIS
4	KAYISI	KARALEKE	MANEP % 80 , % 50 BAKIR OKSİKLORÜR	10-25 NİSAN , 15 -30 MAYIS
5	DOMATES	BEYAZ SİNEK	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT , CYPERMETHRIN	01-15 TEMMUZ
		MİLDİYÖ	MANEP % 80 , % 50 BAKIR OKSİKLORÜR	01-15 TEMMUZ
		YAPRAK BİTİ	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	01-15 TEMMUZ
6	BİBER	BEYAZ SİNEK	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT , CYPERMETHRIN	01-15 TEMMUZ
		YAPRAK BİTİ	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	01-15 TEMMUZ
7	PATLICAN	BEYAZ SİNEK	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT , CYPERMETHRIN	01-15 TEMMUZ
		YAPRAK BİTİ	CHLORPYRFOS ETHYL 480 GR/LT	01-15 TEMMUZ
8	MARUL	İLAÇLAMA YOK	*****	
9	MAYDONOZ	İLAÇLAMA YOK	*****	

## 2.2. Laboratuvar Çalışmaları

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde rastlanılan bireylerden elde edilen kan örneklerinin toplam hacminin, canlılığın hayati fonksiyonlarını sekteye uğratacak miktara ulaşmamasına, vücut ağırlık indeksleri çıkarıldıktan sonra kan alım işlemlerinin yürütülmesi suretiyle dikkat edilmiştir. Bu indekslerde yaklaşık vücut ağırlığının 1 – 1.5 ml/kg kana karşılık gelir, ama kapsamlı bir takım kimyasal ve hematolojik testler için 3 ml/kg a kadar kan alınabilir [100]. Elde edilen kan örnekleri jelli serum ayırma tüpleri ve heparinli tüplere konulmuştur.

### 2.2.1. Sahada hayvandan kan örneklerinin alınması

Sahada kara kaplumbağasına rastlandığında, öncelikle hayvanın davranışı gözlenmiş, sonra da hayvanın kan örneğinin alınacağı görece daha sakin bir alana taşınarak, hem hayvanın stres koşulları indirgenmeye çalışılmış hem de morfolojik ölçümleri ve yararlanılacak bilgiler kayıt altına alınmıştır. Bu sayede hayvan kan almaya uygun hale getirilmiştir.

Kara kaplumbağalarından kan örnekleri kardiyosentez yöntemi ile alınmıştır (Şekil 2.6.) [100].



Şekil 2.6.: Kara kaplumbağasında kardiyosentez ile kan alma

Vakumlu Serum Jel Ayırma tüpleri ve Antikoagulan Heparinli Plazma tüplerine dağıtılan kan örneklerinin üzerlerine etiket bilgileri doldurulmuştur. Temin edilen kan örnekleri +4°C'deki portatif buzdolabı ile Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Ekotoksikoloji Laboratuvarına getirilmiştir.

### 2.2.2. Serum ve Plazma örneklerinin ayrıştırılması

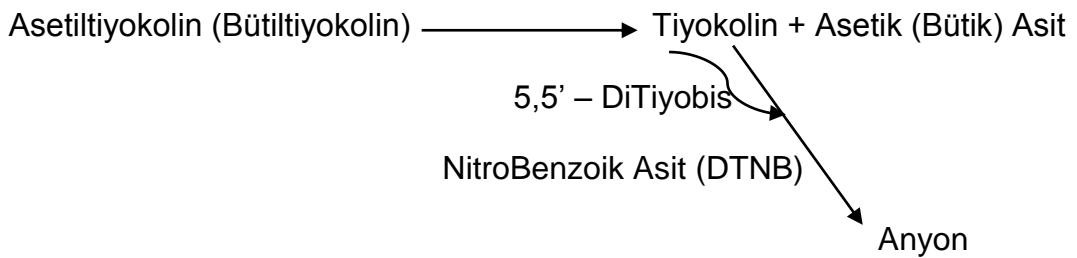
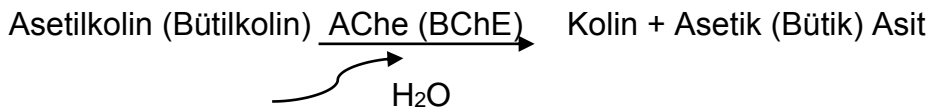
Sahadan laboratuvara getirilen serum ve plazma örnekleri ivedilikle soğutmalı santrifüjde 4°C'de 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Serum örnekleri için tüpün jelli yüzeyinin üstündeki kısmı, plazma örnekleri için tüpün üstündeki sıvı kısım elde edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler, küçük boyutlarda Eppendorf tüplerine etiketlenmek suretiyle dağıtılıp, sonraki analizler için -80°C'li derin dondurucuda saklanmıştır.

#### 2.2.2.1. Serum örnekleri ile incelenen enzimler

Serumda iki tip enzim analizi yapılmıştır. Esteraz enzimleri olan ChE ve CbE'in aktivitesi Castilla La Mancha Üniversitesi Çevresel Bilimler Ekotoksikoloji Laboratuvarı'nda (Toledo – İspanya), oksidatif stres enzimleri olan GST, GPx ve GR'nin aktivite testleri ise Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Toksikoloji Laboratuvarı'nda ölçülmüştür.

##### 2.2.2.1.1. Kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi

Serum kolinesteraz enzim aktivitelerini değerlendirmek için klasik Ellman protokolünden, modifiye etmek suretiyle yararlanılmıştır [101;102]. Bu şekilde hem asetilkolinesteraz hem de bütirikolinesteraz enzimlerinin aktivitesi ölçümünde aşağıdaki protokol uygulanmıştır:



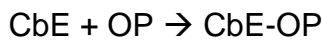
(5-Tiyo-2-Nitrobenzoat)  $\lambda=412\text{nm}$

Serum kolinesteraz aktivitesi için, UV1770 Spektrofotometre cihazı kullanıldı. Etiketlenip, -80°C'li derin dondurucuya kaldırılan örneklerden, oda sıcaklığında 1.5 ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine, 900 mikrolitre ( $\mu\text{l}$ ) 0.1 Molar (M), pH: 8.0 lık fosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ), hidroliz için 50  $\mu\text{l}$  60 milimolar (mM) asetiltiyokolin (AcSCh) [bütiltiyokolin (BuSCh)], 40  $\mu\text{l}$  10 mM DTNB eklendi. Son olarak 10  $\mu\text{l}$  seyreltilmemiş örnek küvetteki reaksiyon solüsyonunun içine eklendi. Karışım spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 412 nanometre (nm) de 1 dakika süreyle “kinetik okuma”ya tabi tutuldu ve absorbans değişim değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerinden ChE aktivitesi  $\Delta \text{ mM/dk} = \text{nmol/mL/dk}$  cinsinden hesaplandı.

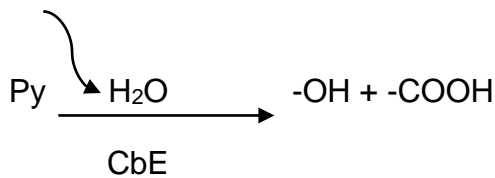
Oda sıcaklığında 1 ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine, 900  $\mu\text{l}$  0.1 M, pH: 8.0 lık fosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ), 40  $\mu\text{l}$  10 mM DTNB eklendi. 50  $\mu\text{l}$  AcSCh ve BuSCh substratları fosfat tamponuyla 0,47-60mM olacak şekilde seyreltilerek ölçüm küvetine eklendi. Daha sonra 10  $\mu\text{l}$  örnek tüpündeki havuzdan alınarak küvetteki reaksiyon solüsyonunun içine eklendi. Karışım spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 412 nanometre (nm) de 1 dakika süreyle “kinetik okuma”ya tabi tutuldu ve absorbans değişim değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerinden ChE aktivitesi  $\Delta \text{ mM/dk} = \text{nmol/mL/dk}$  cinsinden ölçüldü.

### 2.2.2.1.2. Karboksilesteraz aktivitesinin ölçülmesi

Organik fosfatlılar ve karbamatlar katalitik olmayan mekanizmalarla,



Piretiroidler ise katalitik detoksifikasyon ile CbE'ler ile etkileşirler



Serum karboksilesteraz enzimi aktivitesi için, ELISA mikroplak okuyucusu ile ölçüm yapıldı. Serum karboksilesteraz enzim aktivitelerini değerlendirmek için klasik Ellman protokolünden, modifiye etmek suretiyle yararlanılmıştır [101]. Kullanılan cihazın sıvı ölçüm hacmi kapasitesi düşük olmasından ötürü, öncelikle

örneklerin uygun seyreltme oranı çıkarılmıştır: Sonuçta 1/50 oranında distile su ile seyreltilmesi gerektiği tespit edilmiştir.

Michaelis-Menten Sabiti olan  $K_m$  ve enzimin maksimum aktivite gösterdiği andaki hızı olan  $V_{maks}$  için ise her bir örnekten 100  $\mu$ l alınarak yaklaşık 10-15 örnekten elde edilen bir "havuz" örnek tüpü oluşturuldu.

CbE'in ayrı ayrı 4 substratla etkileşimleri incelenmiştir, bu substratların her biri 20 mM'lık stoklarda olup,

i) 1-Naftol ( $\alpha$  – NA) ii) Alfa Naftil Bütirat ( $\alpha$  – NB)

iii) 4-Nitrofenol Asetat (4 – NPA ) iv) 4-Nitrofenol Bütirat (4 – NPB) tır.

ELISA Okuyucuda okunacak kuyucuklara sırasıyla, 5  $\mu$ l seyreltilmiş serum örneği konuldu. Daha sonra kuyucukların üzerine,

- $\alpha$  – NA ve  $\alpha$  – NB için 185  $\mu$ l Tris-HCl Tamponu (0.1 M, pH: 7.6) eklendi.
- 4 – NPA ve 4 – NPB için 180  $\mu$ l Tris-HCl Tamponu (0.1 M, pH: 7.6) eklendi.

Belirtilen substratlardan (her deney setinde farklı bir substrat olmak üzere) kuyucuklara 10  $\mu$ l konuldu.

- $\alpha$  – NA ve  $\alpha$  – NB için: Kuyucuk seti 5 dakika süreyle, 22°C lik sıcaklıkta bekletildi.
- 4 – NPA ve 4 – NPB için: Kuyucuk seti 10 dakika süreyle, 22°C lik sıcaklıkta bekletildi.

Bu inkübasyon işlemlerinden sonra,

- $\alpha$  – NA ve  $\alpha$  – NB için: 50  $\mu$ l %2.5 lik TRITON X-100 içerisinde %2.5 lik SDS ve %0.1 lik FAST RED'den oluşan durdurma solüsyonundan 50  $\mu$ l lik miktar kuyucuğa aktarıldı.
- 4 – NPA ve 4 – NPB için: 50  $\mu$ l %2 lik SDS ve %2 lik TRIS'ten oluşan durdurma solüsyonu aktarıldı.

Durdurma reaksiyonunun sonunda,

- $\alpha$  – NA ve  $\alpha$  – NB için: Karanlık ortamda 30 dakika süreyle beklendi.
- 4 – NPA ve 4 – NPB için: Beklemeksizin okunmasına geçildi.

Karışım mikropilaka kuyucuklarına yerleştirildikten sonra elde edilen absorbans değerlerinden CbE aktivitesi  $\Delta$  mM/dk = mmol/mL/dk cinsinden ölçüldü.

- $\alpha$  – NA ve  $\alpha$  – NB için:  $\lambda = 530\text{nm}$  de,
- 4 – NPA ve 4 – NPB için:  $\lambda = 405\text{nm}$  de kuyucuk seti okunarak, programdan çıkan veriler kaydedildi.

#### **2.2.2.1.2.1. *in vitro* kolinesteraz aktivite ölçümü**

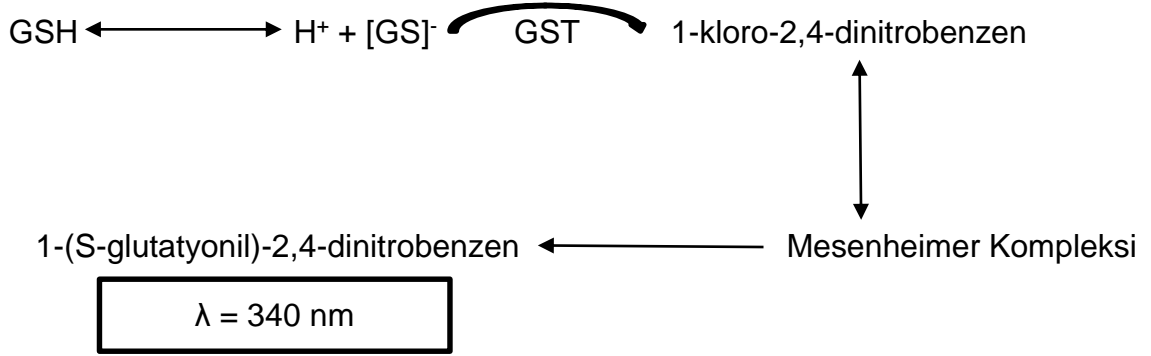
*In vitro* kolinesteraz ölçümü pestisit olarak chloropyrifos tan, inhibitör olarak ise bütirikolinesteraz inhibitörü olan tetraizopropil pirofosforamit (iso-OMPA) ten yararlanılmıştır. UV1770 Spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır. Serum *in vitro* kolinesteraz ve karboksilesteraz enzim aktivitelerini değerlendirmek için klasik Ellman protokolünden, modifiye etmek suretiyle yararlanılmıştır [101].

Her ikisi için de ortak uygulama şöyledir:

Stok pestisit / inhibitör 0.1 M olarak hazırlandı. Serum örneklerinden eşit miktarlarda alınarak “serum örnek havuzu” oluşturuldu. Tampon (fosfat tamponu) ile belirteç (DTNB) ve substrat (AcSCh/BuSCh) hazırlandı. İnhibitör / pestisit içerikli eppendorf tüpler hazırlandı (40  $\mu\text{l}$  örnek havuzundan, 10  $\mu\text{l}$  iso-OMPA/Chloropyrifos solüsyonu). Akabinde seri seyreltmeye tabii tutuldu. Bu şekilde hazırlanan örnekler, 22°C lik su banyosunda, 30 dakika süreyle bekletildi. Oda sıcaklığında 1.5 ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine, 900  $\mu\text{l}$  fosfat tamponu (125 mM, pH:8.0), 50  $\mu\text{l}$  60 mM lik substrat (AcSCh/ BuSCh) konuldu. 40  $\mu\text{l}$  10 mM lik DTNB, 10  $\mu\text{l}$  modifiye edilmiş / seyreltilmiş analiz örneği eklenerek, son hacim 1 mL ye tamamlandı. Karışım spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 412 nm de 1 dakika süreyle “kinetik okuma”ya tabii tutuldu ve absorbans değişim değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerinden *in vitro* ChE ve CbE aktivitesi  $\Delta \text{mM/dk} = \mu\text{mol/mL/dk}$  cinsinden hesaplandı.

### 2.2.2.1.3. Oksidatif stres enzim aktivitelerinin ölçümü

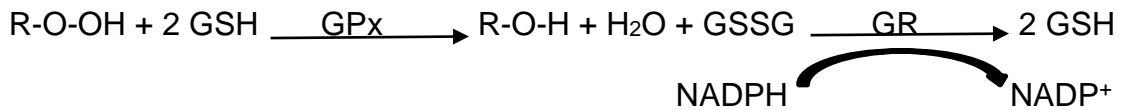
#### 2.2.2.1.3.1. Glutasyon S-Transferaz (GST) aktivitesi ölçümü



Serum GST aktivitesi, UV1770 Spektrofotometre ile ölçüldü. Çalışmada Habig ve ark. (1974) nın geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı [103]. Oda sıcaklığında 1ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine,

910 µl 0.1 M, pH: 6.5 lik fosfat tamponu (HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), kofaktör olarak 50 µl 0.1 M GSH ve substrat olarak 20 µl CDNB eklendi. Sonra 20 µl seyreltilmemiş örnek ölçüm küvetindeki reaksiyon solüsyonunun içine eklenerek son hacim 1 mL'ye tamamlandı. Karışım spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 340 nm de 1 dakika süreyle "kinetik okuma"ya tabi tutuldu ve absorbans değişim değerleri kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerinden GST aktivitesi Δ mM/dk = µmol/mL/dk cinsinden hesaplandı.

#### 2.2.2.1.3.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmesi



Serum GPx aktivitesi, UV1770 spektrofotometre ile ölçüldü. Çalışmada Lawrence ve ark. (1976) nın geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı [104]. İnkübasyon tamponu içinde 100 mM, pH: 6.5 lik fosfat tamponu (HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1mM DTT ve 1mM EDTA-Na<sub>2</sub> olacak şekilde hazırlandı.

Oda sıcaklığında 1ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine,

Hazırlanan inkübasyon tamponundan 578 µl, 40 µl 2 mM lık GSH, 32 µl 0.24 mM lık NADPH ve 20 µl 0.8 mM lık Cumene – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 30 µl (1 IU/mL) GR eklenerek, son olarak 100 µl seyreltilmemiş örnek küvetteki reaksiyon solüsyonu ilave edilip, son hacim 800 µL'ye tamamlandı. Karışım spektrofotometreye yerleştirildikten sonra 340 nm de 1 dakika süreyle “Kinetik okundu” ve absorbans değişim değerleri deney defterine kaydedildi. Elde edilen absorbans değerlerinden GPx aktivitesi  $\Delta$  mM/dk =  $\mu$ mol/mL/dk cinsinden hesaplandı.

### **2.2.2.1.3.3. Glutasyon Redüktaz (GR) aktivitesinin ölçülmesi**

Serum GR aktivitesi için, UV1770 spektrofotometre ile ölçüldü. Çalışmada Carlberg ve Mannervik'in (1975), geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı [105].

Oda sıcaklığında 1ml lik tek kullanımlık spektrofotometre ölçüm küvetlerine, 885 µl 0.1 M, pH: 7.0 lik fosfat tamponu (HNa<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 25 µl 2.4 mM NADPH ve 40 µl seyreltilmemiş örnek küvetteki sıvının içine eklendi. Sonra 50 µl GSSG küvetteki solüsyonun içine eklenerek son hacim 1 mL'ye tamamlandı ve reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon ilerledikçe GSSG'den GSH oluşumu spektrofotometrede 340 nm de 1 dakika izlenerek elde edilen absorbans değerlerinden spesifik GR aktivitesi  $\Delta$  mM/dk =  $\mu$ mol/mL/dk olarak hesaplanıp, kaydedildi.

### **2.2.2.2. Plazmada hormonların analizi**

Plazma eşey hormonları [Testosteron (T) ve Estradiol (E<sub>2</sub>)] seviyeleri Cayman Testosterone ELISA kiti ve Cayman Estradiol ELISA kiti ile ELISA mikroplaka okuyucusunda okunarak tespit edilmiştir.

#### **2.2.2.2.1. Testosteron seviyesinin ölçülmesi**

Hormon analizlerinde, her kuyucuğun farklı fonksiyonları vardır ve bu şekilde kuyucuklar arası ilişkilerle örneklerdeki hormon seviyesi anlaşılabilir. Bu bağlamda kuyucuk seti, her kuyucuğa tanımına uygun biçimde reaksiyonu gözlenebilecek şekilde aşağıdaki tablo (Tablo 2.3.) halinde tasarlanmıştır:



Tablo 2.3.: Kullanılan kuyucukların özellikleri

Kuyucuk	EIA tamponu	Standart/Örnek	İşaretleyici	Antibadi
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 µl (*set gelişim aşamasında)	-
NSB	100 µl	-	50 µl	-
B <sub>0</sub>	50 µl	-	50 µl	50 µl
Std/Örn	-	50 µl	50 µl	50 µl

Kör kuyucuk (Blk): Tampon yada işaretleyici hiçbir kimyasalın konulmadığı kuyucuk; Toplam Aktivite (TA): Enzim bağlantılı işaretleyici ile hesaplanan toplam enzim aktivitesi; Spesifik Olmayan Bağlanma (NSB): İşaretleyicinin kuyucuğa immünolojik olmayan bağlantısı; Maksimum Bağlanma (B<sub>0</sub>): İşaretleyicinin, serbest analit yokluğunda antibadiye bağlanan maksimum miktarı; %B/ B<sub>0</sub>: Örnek veya standart kuyucuk absorbansının, maksimum bağlanma kuyucuğuna oranı; EIA: Enzim immun assay

#### Kuyucuk Seti İnkübasyonu:

Her bir kuyucuk seti, oda sıcaklığında, plastik film ile kuşatılarak Orbital çalkalayıcıda 2 saat inkübe edilmiştir.

#### Kuyucuk Seti Gelişimi:

Kuyucuklar boşaltılıp, Yıkama Tamponu ile 5 kez temizlendi. Her bir kuyucuğa 200 µl Ellman belirteci eklendi. Toplam aktivite kuyucuğuna ise, ayrıca 5 µl işaretleyici eklendi. Kuyucuk seti plastik bir film ve alüminyum folyo ile üstü örtüldükten sonra, Orbital çalkalayıcı üstünde yavaşça 90 dakika çalkalandı.

#### Kuyucuk Setinin Okunması:

Kuyucuk seti, her bir kuyucuğun etiketinin kaydedilmesiyle birlikte 405 – 420 nm dalga boylarında okunmuştur.

$$\text{logit} \left( \frac{B}{B_0} \right) = \ln \left[ \frac{\frac{B}{B_0}}{1 - \frac{B}{B_0}} \right]$$

Denklemiyle elde edilen logaritmik verilerden logit (B/ B<sub>0</sub>) e karşılık log konsantrasyonları ile lineer regresyon grafiğine dönüştürülüp, örneklerin plazma testosteron seviyeleri saptanmıştır.

#### **2.2.2.2. Estradiol seviyesinin ölçülmesi**

Testosteron gibi, Estradiol için de üretici firmanın direktifleri doğrultusunda, benzer bir tablo ve hesaplamadan yararlanılmıştır. Sadece fark olarak, seyreltme miktarları ve inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür.

#### **2.2.3. İstatistiksel analizler**

Enzim ve bu enzimlerin substratlarının aktivite değerlerinin hangi faktörlerden etkilendiği genel doğrusal modeller ile sınanmıştır. Modellerde ele alınan faktörler, alan, ay, karapas uzunluğu, kondisyon faktörü, cinsiyet ve kene varlığıdır. Her bir faktörün her bir enzimi ve substratını etkileyip etkilemediği öncelikle tek yönlü bir analizle sınanmış, elde edilen istatistiksel anlamlılık değerlerine göre, faktörlerin modellere hangi sırada sokulacağı belirlenmiştir. Buna göre, verilerdeki değişkenliği tek yönlü olarak anlamlı bir şekilde açıklayan alan ve ay faktörleri modele ilk sıralarda sokulmuş, diğer faktörler ise sırasıyla modellere dâhil edilmiştir. Tüm enzim grupları için ağırlık ile kondisyon faktörü değişkenleri arasında istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı ( $r^2 = 0,78$ ,  $P < 0,01$ ) bir korelasyon tespit edilmiştir (Spearman sıra korelasyon analizi). Bu nedenle, model analizlerine bu iki değişkenden yalnızca kondisyon faktörü dahil edilmiştir.

Model analizlerinde, her bir faktörün ve faktörler arası etkileşimlerin her bir enzim/substrat üzerindeki etkileri sınanmış ve istatistiksel anlamlılıkları  $p = 0.05$  seviyesinde test edilmiştir. Herhangi bir faktörün bir enzim üzerinde 0.05'den küçük bir olasılık değerinde etkisi olduğu saptandığında, bu faktörün enzimi etkilemiş olduğu sonucuna varılmıştır.

Analizden önce, her bir veri grubunun normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilk testiyle, varyansların homojenliği ise Bartlett testi ile sınanmıştır. Verilerin

normale en yakın şekilde dağılmalarını sağlamak için, tüm veri gruplarına logaritmik dönüşüm uygulanmıştır. Daha sonra yapılan tüm analizler logaritmik olarak dönüştürülmüş veri setleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Yukarıda değinilen tüm istatistiksel analizler R istatistik programı ile gerçekleştirilmiştir (R Development Core Team, 2012).

### 3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

#### 3.1. Saha Çalışma Sonuçları

##### 3.1.1. Populasyon çalışmaları

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı Nisan – Ekim aylarında yürütülen saha çalışmaları sırasında yakalanan bireylerin kondisyon faktörlerinin hesaplanabilmesi için morfolojik olarak düz karapas boyu (DKB) ölçülmüş ve vücut ağırlıkları (gram) alınmıştır.

Kaplumbağa Vadisi'nde toplamda 27 erkek, 28 dişi birey (toplam 55 birey); Nar Vadisi'nde ise 17 erkek, 17 dişi bireyden (toplam 34 birey) çalışmamızda yararlanılmıştır. Bu bireylerin zamana, alana ve eşeylerine göre dağılımını gösterir Tablo 3.1. de sunulmuştur.

Tablo 3.1.: Nar Vadisi ve Kaplumbağa Vadisi kara kaplumbağasının aylara göre örneklem tablosu

	Nisan		Mayıs		Haziran		Temmuz		Eylül		Ekim													
	NV	KV	NV	KV	NV	KV	NV	KV	NV	KV	NV	KV												
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀												
Eşeye göre toplam	5	2	4	2	1	5	2	6	5	1	2	6	1	0	3	3	1	0	2	2	2	4	2	
Toplam kaplumbağa	7		6		6		8		6		8		5		15		6		12		4		6	
Her tarihe göre toplam kaplumbağa	13		14		14		20		18		10													

Kapadokya bölgesi'ndeki kara kaplumbağalarının yaşam döngüleri için uygun alanlar olduğu düşünülen iki vadide yapılan araştırmalar neticesinde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Kaplumbağa Vadisi'nde görece çok daha geniş bir alanın izlenmesine rağmen, kara kaplumbağalarının yoğun olarak bulunduğu bölgenin büyüklüğü, Nar Vadisi'nde izlenen bölgenin büyüklüğüne yakındır. Bir diğer deyişle, Nar Vadisi içerisinde izlenen bölgenin tamamında kara kaplumbağalarına rastlanmıştır.

Her ayın belli dönemlerinde yapılan saha çalışmalarında dişi ve erkek birey örnekleminde gözlenen orantısızlık, hayvanın aylara göre öne çıkan aktivite durumuyla ilişkilendirilebilir [106;107].

Ölçülen en küçük birey Nar Vadisi'nde yakalanan ve düz karapas boyu uzunluğu 177,59 mm olan erkek bir bireydir. Ölçülen en büyük birey ise Kaplumbağa Vadisi'nde yakalanan ve düz karapas boyu uzunluğu 271,84 mm olan erkek bir bireydir.

Tartılan en hafif birey Kaplumbağa Vadisi'nde yakalanan ve ağırlığı 1050 g olan erkek bir bireydir. Ölçülen en ağır birey ise yine Kaplumbağa Vadisi'nde yakalanan ve ağırlığı 4217 g olan dişi bir bireydir.

Kaplumbağa Vadisi'nde yakalanan erkek ve dişi bireylere ait morfometrik ölçümler ve ağırlıklar Tablo 3.2.de gösterilmiştir. Populasyondaki dişi bireylerin ortalama düz karapas boyu ve ağırlıkları erkek bireylerde kaydedilen ortalama değerlerden büyüktür. Erkek ve dişi bireylerin düz karapas boyu uzunlukları arasındaki fark t testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Buna göre Kaplumbağa Vadisi populasyonundaki dişi bireylerin, erkek bireylerden büyük olduğunu söyleyebiliriz.

Tablo 3.2: Kaplumbağa Vadisi kara kaplumbağaları örneklerinde ortalama boy uzunlukları ve ortalama ağırlıkları

ALAN: Kaplumbağa Vadisi		Erkek		
Karakter	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	28	209,59	178,97 - 272	18,09
Ağırlık (g)		1659,04	1050 - 2667	337,45
		Dişi		
	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	28	228,78	194 - 262	15,34
Ağırlık (g)		2644,52	1724 - 4217	662,2
		Erkek - Dişi		
	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	56	219,29	178,97 - 272	19,15
Ağırlık (g)		2144,17	1050 - 4217	715,71

$p < 0,05$ ; N: birey sayısı; SS: standart sapma

Nar Vadisi'nde yakalanan erkek ve dişi bireylere ait morfometrik ölçümler ve ağırlıklar Tablo 3.3. de gösterilmektedir. Populasyondaki dişi bireylerin ortalama düz karapas boyu ve ağırlıkları erkek bireylerde kaydedilen ortalama değerlerden büyüktür. Erkek ve dişi bireylerin düz karapas boyu uzunluğu arasındaki fark Mann-Whitney testine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0,05$ ). Buna göre Nar Vadisi populasyonunda dişi bireylerin erkek bireylerden büyük olduğu söylenebilir.

Tablo 3.3: Nar Vadisi kara kaplumbağaları kara kaplumbağaları örneklerinde ortalama boy uzunlukları ve ortalama ağırlıkları

ALAN: Nar Vadisi		Erkek		
Karakter	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	17	203,5	177,59 - 248	18,4
Ağırlık (g)		1732,48	1094 - 2843	397,72
		Dişi		
	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	18	226,5	197 - 251	14,94
Ağırlık (g)		2643,89	1418 - 3748	634,7
		Erkek - Dişi		
	N	Ortalama	Min - Maks	SS
DKB (mm)	35	215,32	177,59 - 251	20,18
Ağırlık (g)		2201,2	1094 - 3748	699,61

$p < 0,05$ ; N: birey sayısı; SS: standart sapma

Karapas uzunluğu, vücut ağırlığı ve bunlarla ilişkili olan kondisyon faktörü kavramının hayvan ekolojisi tartışmalarında bir canlı için en önemli karakterlerden olduğu ifade edilmektedir. Vücut oranları ile fizyolojik işlevler arasındaki korelasyonları çalışmak yalnızca türün vücut ölçülerini belirtmekle kalmaz, aynı zamanda türün vücut büyüklük dağılımıyla karşılaştırma yapılmasına da imkan verir [108]. Örneğin balıklarda kondisyon faktöründeki

varyasyonun, kontamine alanlarla ilişkili olduğu saptanmıştır [109]. Aynı şekilde kertenkelelerde de pestisit kaynaklı toksik etki ile kondisyon faktörü arasında direk ilişki olmasa bile, çoklu etkileşim dahilinde canlının verdiği yanıtı etkilediği görülebilir [48].

### 3.1.2. Aktivite çalışmaları

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde kara kaplumbağalarının besin tercihleri, 2012 yılı Nisan – Ekim ayları arasında yapılan çalışmalarda gözlemler sonucu şöyle saptanmıştır. *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Poaceae* familyalarına ait bitkilerin her iki alanda besin olarak tercih edildiği gözlenmiştir. *Lamiaceae*, *Chenopodiaceae*, *Scrophulariaceae* familyalarına ait doğal bitkiler ve ceviz (*Juglans regia*), üzüm (*Vitis sp.*), elma (*Malus domestica*), kayısı (*Prunus armeniaca*), domates (*Solanum lycopersicum*), biber (*Capsicum sp.*), patlıcan (*Solanum melongena*), marul (*Lactuca sativa*) ve maydanoz (*Petroselinum crispum*) gibi kültür bitkilerinin yaprak ve meyvelerinin ise yalnızca tarım amaçlı olarak ekiminin yapıldığı Nar Vadisi'nde besin maddesi olarak tüketildiği kaydedilmiştir.

Gastro-intestinal parazitik nematodların varlığı, toplanan dışkı örneklerinin makroskobik ve mikroskobik incelemesi ile ortaya konmuştur. Bireylerden elde edilen dışkıların tamamında kara kaplumbağalarında sıklıkla rastlanan parazitler bulunmuştur. Bulunan parazitler Nemathelminthes şubesinde Oxyurida (*Tachygonetria spp.*) ve Ascaridida (*Angusticaecum spp.*) ordosuna aittir.

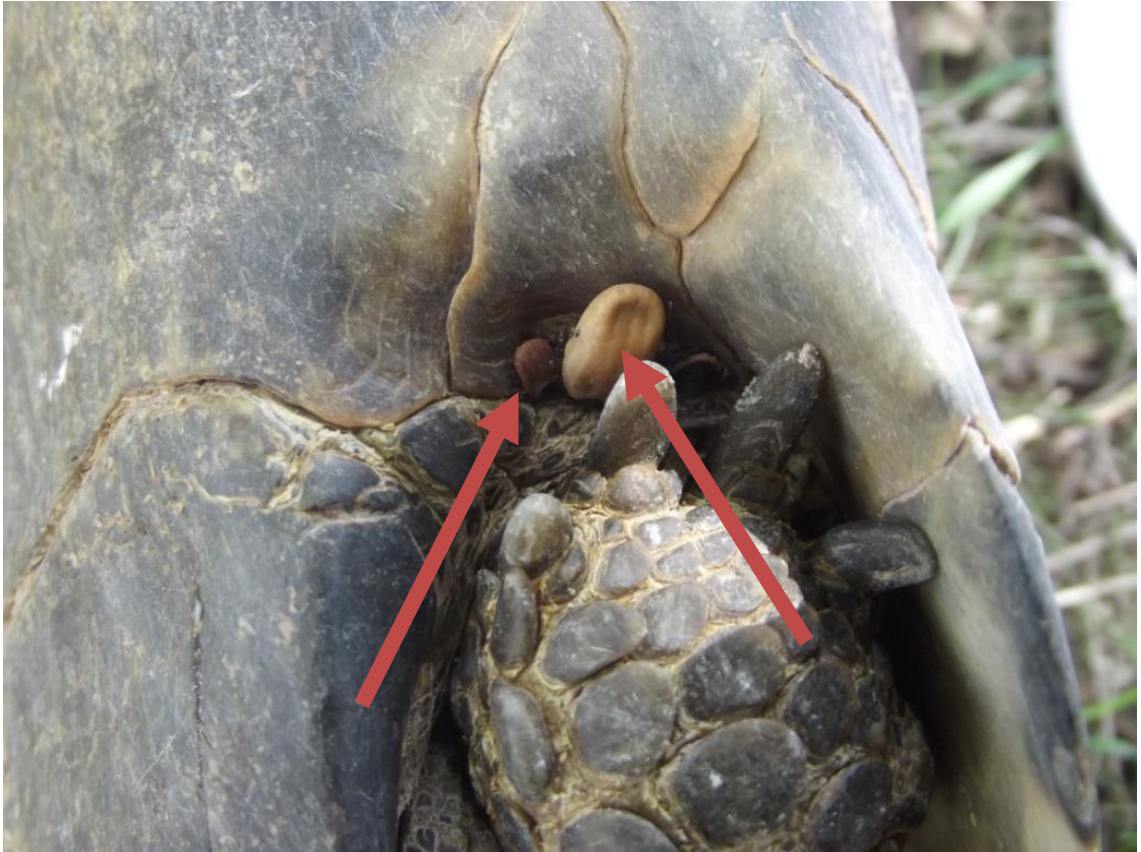
Kara kaplumbağalarının yaşam alanlarındaki bitkiler ele alındığında ise hepsini enerji sağlama amaçlı tüketmedikleri ortaya çıkar. Örneğin *Astragalus sp* (Fabaceae) bitkisinden hibernasyon ve estivasyon döneminde sığınak olarak yararlanırken, her iki çalışma alanındaki *Artemisia'* yı anti-helmintik olarak tüketiyor olabilir [5;23;110;111]. Anti-helmintik strateji olarak yorumlanabilecek bu durum *T. graeca*, *T. hermanni*; *Eretmochelys imbricata*, *T. horsfieldi* gibi kaplumbağa türlerinde kaydedilmiştir [6;98]. Zira bu iki çalışma alanında kara kaplumbağalarından elde edilen dışkı örneklerindeki parazitler, Nemathelminthes şubesinde *Tachygonetria spp.* (Oxyurida) ve *Angusticaecum spp.* (Ascaridida) ordolarına aittir. Bu durum Oxyuridlerin konağı ile kommensal bir ilişkisi olabileceğini gösterir [5]. Ancak tüm dışkılarda bu oxyuridlere rastlandığından istatistiksel bir anlamı olup olmadığı tespit edilememiştir.

Çalışmada yakalanan bütün bireylerde ektoparazitlerin varlığı araştırılmış olup, her iki çalışma alanında da kara kaplumbağalarında nimf ve ergin evrede *Hyalomma aegyptium* türü keneler tespit edilmiştir.

Kaplumbağa Vadisi'nde dişi bireylerin %46,4'ünde ve erkek bireylerin %62,9'unda kene tespit edilmiştir. Nar Vadisi'nde ise dişi bireylerin %47,05'inde ve erkek bireylerin %76,47 sinde kene tespit edilmiştir (Tablo 3.4.). Dolayısıyla her iki alanda benzer parazit enfestasyonu görülmektedir.

Tablo 3.4: Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisinde kara kaplumbağalarında saptanan kene enfestasyonu

ALAN	Eşey	Toplam birey sayısı	Keneli birey sayısı	Yüzde (%)
Kaplumbağa Vadisi	♀	28	13	46,4
	♂	27	17	62,9
Nar Vadisi	♀	17	8	47,05
	♂	17	13	76,47



Şekil 3.1. Kara kaplumbağalarında ekto-parazit olarak bulunan erkek (sol) ve dişi (sağ) *Hyalomma aegyptium*.



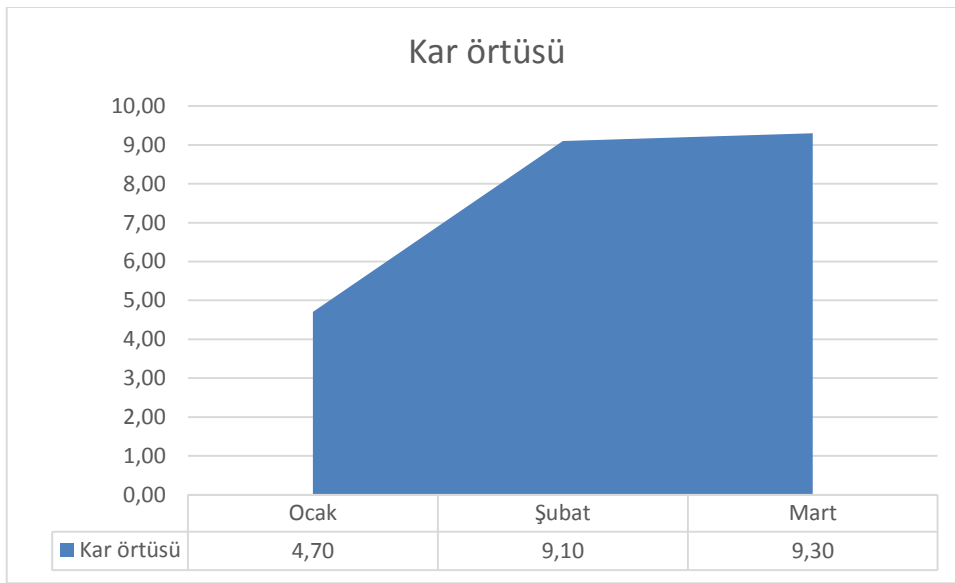
Kara kaplumbağalarının farklı türlerde kenelerle enfeste olmasına rağmen, bu çalışma içerisinde farklı bir kene türüne rastlanmamıştır. Yunanistan'da incelenen kara kaplumbağaları üzerinde de yalnızca *H. aegyptium* türü keneler tespit edilmiştir [112]. Bulgaristan'da incelenen kara kaplumbağaları üzerinde ise *H. aegyptium* ile beraber *Haemaphysalis erinacei taurica*, *Hyalomma anatolicum excavatum*, *Hyalomma marginatum marginatum* türü keneler kaydedilmiştir [113]. Ayrıca Yunanistan'da *T. marginata*'ların *Rhipicephalus sanguineus* türü [114] ve *T. hermanni*'lerin *Haemaphysalis inermis* türü kenelerle enfeste olduğu [115;116] tespit edilmiştir. Kaplumbağa Vadisi'nin mera olarak, küçükbaş hayvanların otlatılması için yoğun olarak kullanılması ve civarındaki hayvan çiftlikleri, bu bölgedeki kara kaplumbağalarının kene enfeksiyonunun nedeni olabilir. Nar Vadisi ise tarımsal faaliyetlerin yürütüldüğü bahçelere yakındır ve bu bölgedeki bireylerin küçükbaş hayvanlarla herhangi bir ilişkisi söz konusu olmamasına rağmen benzer yoğunlukta kene enfeksiyonu, bu alandaki populasyon için de geçerlidir.

Kara kaplumbağalarının hibernasyondan çıkış zamanları ve hibernasyon alanları ile ilgili çalışmalar, 2012 yılı ilkbahar döneminde gerçekleştirilmiştir. Çalışma alanlarında, ilk olarak 2012 yılının Nisan ayı içerisinde hibernakulumlar tespit edilmiştir. Söz konusu yılda kar örtüsünün geç kalkması nedeniyle, hibernakulum araştırmalarına, Nisan ayının ortalarında başlanmıştır. Hibernakulumların tamamen terk edilmesi yaklaşık iki haftalık bir zamana yayılmıştır. 22 Nisan, 2012 yılı için hibernasyon döneminin sona erdiği tarih olarak değerlendirilmiştir.

Kara kaplumbağalarının Kaplumbağa ve Nar Vadisi'ndeki yıllık aktivite döngüleri içerisinde, aktif ve inaktif dönemin birbirini takip ettiği kaydedilmiştir. Buna göre Ekim – Nisan ayları arasında hibernasyon dönemiyle aktivitelerini sonlandırdıkları ve Ağustos – Eylül ayları arasında estivasyon dönemiyle aktivitelerini azaltmaları nedeniyle kara kaplumbağalarının aktivitelerinin, mevsimsel parametrelerden etkilendiği söylenebilir. Diğer sürüngenler ve coğrafyalarla karşılaştırıldığında, örneğin farklı bölgelerde yaşayan dört farklı Akdeniz kaplumbağasının her yıl bir veya iki inaktivasyon sürecinin olduğu farklı aktivasyon döngülerinin olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle türe bağlı olarak estivasyonun ve hibernasyonun önemi değişmektedir. Örneğin Yunanistan'da ve Fransa'da *Testudo hermanni* kış döneminde hibernasyonla inaktivite sürecini uzatır, yaz dönemi ise aktivitesini

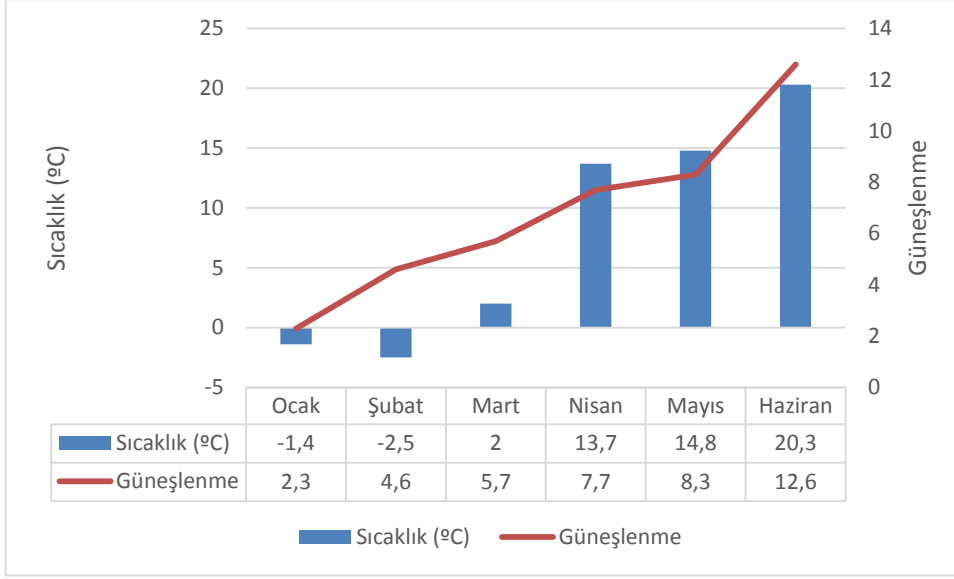
tamamen sonlandırmak yerine yalnızca azaltır. Mısır'da ise *Testudo kleinmani* kışın aktivitesini sürdürürken yaz mevsimi içerisinde estivasyonla inaktivasyon sürecini uzatır. Özetle Yunanistan'da *T. marginata* ve İspanya'da *T. graeca*'nın birçok Akdeniz sürüngeninde olduğu gibi yazın ve kışın olmak üzere iki uzun inaktivite dönemi vardır [20;117]. Bu nedenle kara kaplumbağaları bu bölgelerde ancak yılın yalnızca yarısı aktiftir ve sıcaklık aktiviteyi biçimlendirici en önemli faktördür.

Aylara göre ortalama kar örtüsü değerlerinin, Nisan ayına yaklaştıkça arttığı görülmektedir (Şekil 3.2.).



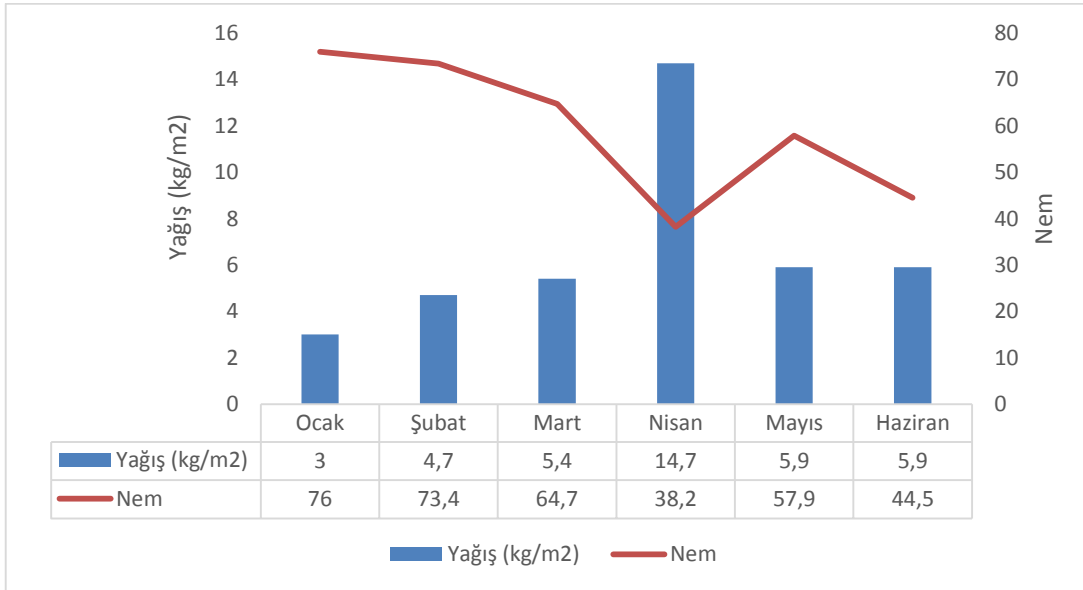
Şekil 3.2.: 2012 yılı Ocak, Şubat ve Mart aylarındaki kar örtüsü değerleri

Ancak Mart ayı ortalama hava sıcaklığının ( $2^{\circ}\text{C}$ ) iken Nisan ayı ortalama hava sıcaklığının  $13,2^{\circ}\text{C}$  ye yükseldiği ve güneşlenme değerlerinin de mevsimle beraber arttığı saptanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3.: Hibernasyondan çıkış dönemi için sıcaklık ve güneşlenme değerleri

Hibernasyon sonlanmadan önceki ve hibernasyon sonlandıktan sonraki dönemde yağış ve nem değerlerine bakıldığında ise yağışın Nisan'a doğru azalsa da Mayıs'ta bir artışın söz konusu olduğu ve nemin de Nisan ayında en düşük seviyede olduğu görülür (Şekil 3.4.).



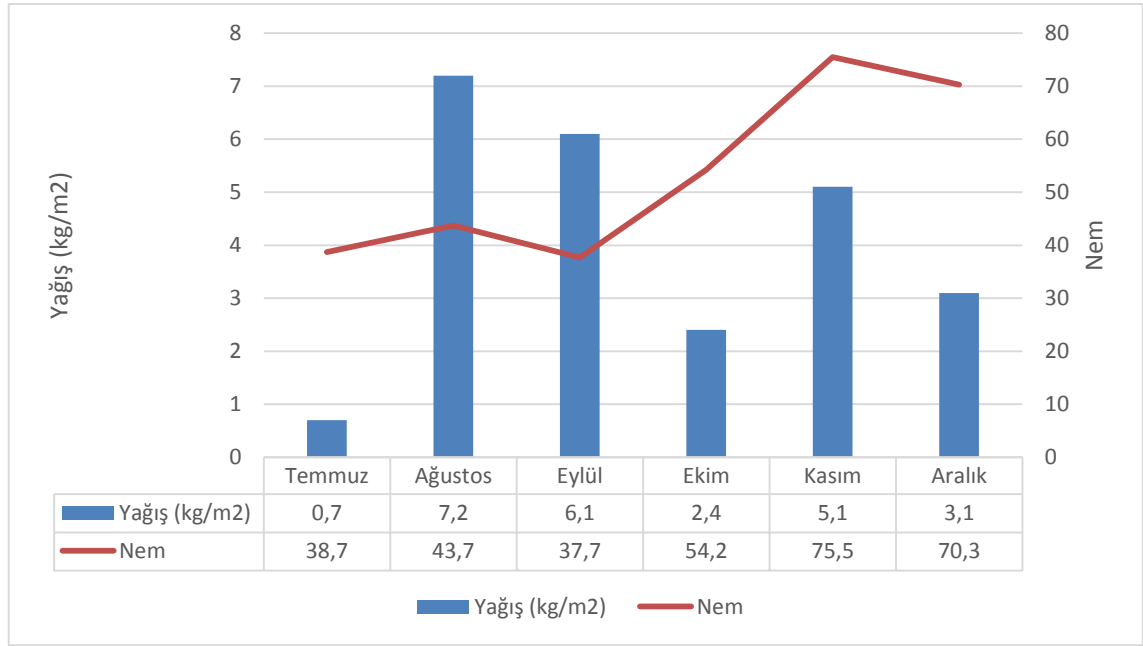
Şekil 3.4.: Her iki alanda hibernasyondan çıkış dönemi için yağış ve nem değerleri

Bu veriler ışığında, hibernakulumların terk edilmesini tetikleyen koşulların, kar örtüsünün kalkması, ortalama hava sıcaklığının artması ile nem ve yağış değerlerinin düşmesi ve güneşlenmede artışa neden olduğu söylenebilir.

Ekim ayında alanlardaki bireylerden son örnekler elde edilmiş olup, hiç aktif bireye rastlanılmayan saha çalışmasının yapıldığı tarih olarak 10 Kasım 2012 hibernasyona geçişin tamamlandığı tarih olarak kabul edilmiştir.

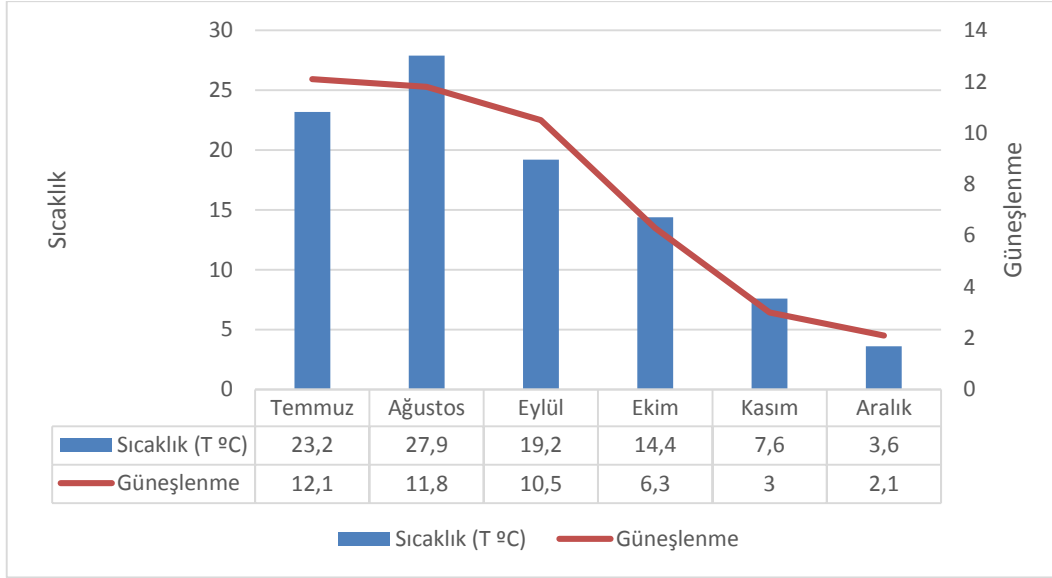
Nar Vadisi'nde daha önce kullanıldığı bilinen hibernakulumları kullanan bireylere rastlanmamıştır. Bunun nedeni Nar Vadisi'nde daha gelişmiş vejetasyon, hibernasyon için kullanılabilir alanların daha fazla olmasından olabilir.

Ortalama nem ve yağış değerlerinin hibernasyon dönemine yaklaştıkça arttığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5.: Hibernasyona giriş dönemi için ortalama yağış ve nem değerleri

Ortalama sıcaklık ve güneşlenme değerlerinin ise hibernasyon dönemine yaklaştıkça azaldığı ifade edilebilir (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6.: Hibernasyona giriş dönemi için, ortalama hava sıcaklığı ve güneşlenme değerleri

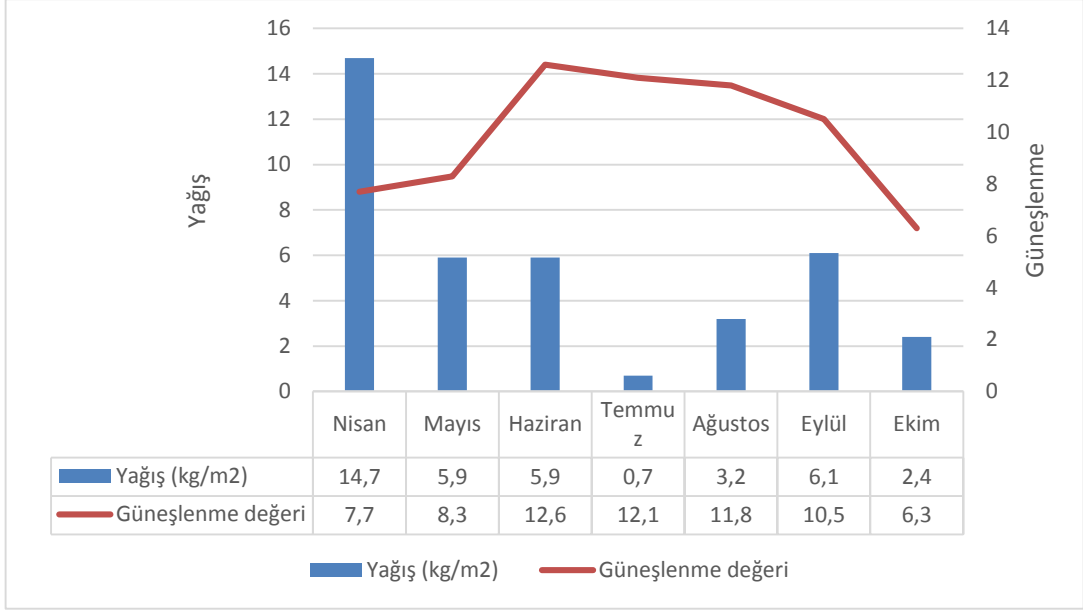
Bu meteorolojik verilere göre ektoterm bir tür olan kara kaplumbağasının hibernasyon davranışı üzerinde hava sıcaklığının azalması ve yağışların başlaması etkili olmaktadır. Ancak sonbahar aylarında hava sıcaklığı değerlerinin mevsim normallerinin üzerinde seyretmesi hibernasyon döneminin daha geç başlamasına neden olabilir.

Kara kaplumbağalarının 2012 yılında Mayıs – Eylül ayları arasında estivasyon davranışıyla aktivitelerini azalttıkları gözlenmiştir. Bu türün bu bölgede ilkbahar dönemi çiftleşme faaliyetlerinden hemen sonra, sonbahar dönemi çiftleşme faaliyetine kadar geçen sürede zamanının çoğunu estivasyon için kullanılan özel alanlarda dinlenerek geçirdiği tespit edilmiştir.

### 3.1.3. Üreme çalışmaları

Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi'nde 2012 yılı çiftleşme dönemleri izlenmiştir. İlkbahar döneminde hibernasyondan çıktıktan hemen sonra ve sonbahar döneminde hibernasyona girmeden hemen önce çiftleşme aktivitesi kaydedilmiştir. Çiftleşme aktivitesinin hibernasyonun sonlanma ve başlama zamanından etkilendiği saptanmıştır.

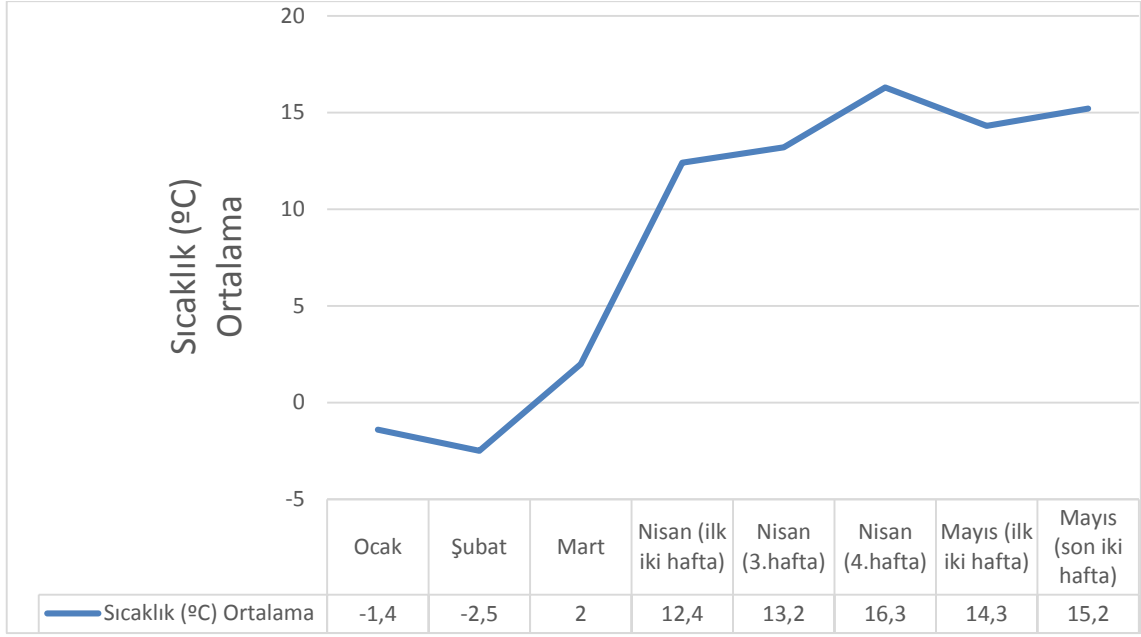
İlkbahar ve sonbahar dönemi çiftleşme aktivitesi ve çiftleşme dönemi üzerinde hava sıcaklığı, güneşlenme ile yağış ve nem değerleri gibi meteorolojik faktörlerin etkisi de araştırılmıştır.



Şekil 3.7.: Nisan – Ekim ayları arası yağış ve güneşlenme değerleri

Hibernasyon sonrası dönemde hava sıcaklığının yükselmesi, hibernasyon öncesi dönemde ise hava sıcaklığının düşmesi çiftleşme aktivitesini sonlandırmıştır. İlkbahar ve sonbahar çiftleşme dönemlerinde ortalama yağış ve güneşlenme değerlerine göz atıldığında Nisan ayında kaydedilen görece düşük yağış değerlerinin hemen hemen Ekim ayı ile benzer bir örüntüde olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 3.7.) .

Hava sıcaklığının artması hibernasyon sonrası dönemde çiftleşme aktivitesini başlatır. Nisan ayı içerisinde hava sıcaklığının artması ile başlayan çiftleşme aktivitesi, hava sıcaklığının giderek yükselmesi ile sonlandırılır (Şekil 3.8..).



Şekil 3.8.: Ocak – Mayıs arası ortalama sıcaklık değerleri

Çalışma alanlarında meteorolojik faktörlerin hibernasyonun başlama ve sonlanma tarihlerini, hibernasyon ve estivasyon sürelerini, çiftleşmeye ayrılan zamanı yani yaşamsal her türlü aktiviteyi etkilediği gözlenmiştir. İklimsel değişikliklere hassasiyet göstergesi olarak, türün meteorolojik faktörler ile etkilenen aktivite döngüsü incelenebilir. Ancak iklimsel değişikliklere ekolojik cevaplar, daha çok lokal düzeyde verilir [118]. Lokal ekolojik değişiklikler, direkt olarak populasyonun demografik oranları ile ilişkilidir. Kimi koşullarda lokal iklimsel değişikliklerin populasyonlar üzerindeki yaratacağı olumsuz etkilerin, diğer mortalite ajanlarının yaratacağı olumsuz etkilerden daha çok öne çıktığı da ifade edilebilir [119;120].

Bazen de belli bir döneme denk gelen önemli olayları ele alırken, o dönemdeki olayın sonucunu anlamada uzun soluklu periyotlarda söz konusu bileşenin etkisini incelemek yarar sağlayabilir, örneğin önümüzdeki onyıllar içerisinde kışın yağmur düşüşü miktarında istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma, *Testudo* populasyonlarını olumsuz etkileyecektir [120]. Çünkü yağış, ortamdaki su ve besin kaynağı ile direkt ilişkilidir. Bu sayede kaplumbağaların beslendikleri bölgelerde, su ve besin içeriğinin artmasının folikül geliştirme dönemindeki dişi bireylerin sağlığıyla yakından ilişkili olduğu gözlenmiştir [20]. Ancak kış yağışının bol olması da risklidir, zira bu durumda su seviyesinin yükselmesiyle

kaplumbağaların beslenme alanını etkilediği ve canlının üreme döneminde vücut kondisyonunu etkilediği söylenebilir.

Kuraklık da bir anlamda yağıştan farksızdır. Bu koşulların günlük değil de dönemlik olması kara kaplumbağalarını kimi zaman estivasyona götürür. Nitekim yaptığımız bu çalışmalarda Ağustos ayına ait örnek grubunun olmaması, kara kaplumbağalarının o ay yüksek estivasyonunun sonucudur.

### **3.2. Laboratuvar Sonuçları**

#### **3.2.1. Serum örnekleri ile incelenen enzim aktiviteleri**

Organik fosforlu insektisitler, pestisitlerin önemli bir grubunu oluştururlar. Bu sınıf bileşiklerin başarısını üç ana karakter tanımlar: (1) çevrede organik klorlu pestisitlere kıyasla daha hızlı bozunmaları ve görece düşük seviyede kalıcı olmaları, (2) biyotada düşük birikimleri (3) genellikle yüksek akut toksisite göstermeleri. OP ler, hidroliz, fotoliz, mikrobiyal degradasyon gibi birçok fizyokimyasal ve biyolojik süreçte etkili rol oynayabilirler [121]. Bu anlamda belli biyolojik belirteçleri, ChE aktivitesi inhibisyonunu tayin etmede yararlı olarak değerlendirmek, doğadaki OP'ye maruz organizmaların subletal yanıtlarını görme bakımından fayda sağlar. Esasında organizmanın yağ dokularında biriken bu grup bileşikler, OP temizleyici B tipi esteraz enzim aktiviteleri üzerine (bilhassa kolinesteraz ve karboksilesteraz) etkilidirler.

B tipi esterazların (BChE ve CbE gibi), OP biyotemizleyicisi olarak etkileri gerek memelilerde gerekse de sürüngenlerde birçok çalışma ile gösterilmiştir [48;69;122-126].

##### **3.2.1.1. Kolinesteraz enzim aktivite sonuçları**

Kolinesteraz aktivitesi serumda ölçülmüş ve sonuçlar alana, aylara, organizmanın boyutuna ve kondisyonuna göre analiz edilerek tablo ve grafikler ile aşağıda sunulmuştur.



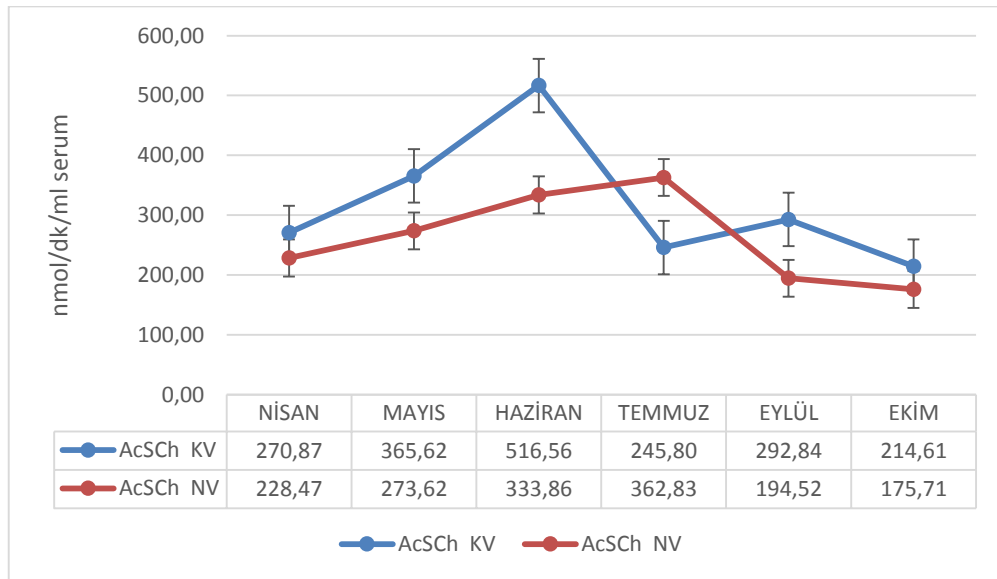
Tablo 3.5.: ChE – AcSCh etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler

AcSCh için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	(p)
Alan	1	0.4712	0.47123	5.7568	0.053343	
Ay	5	4.1968	0.83936	10.2541	0.006676	**
Alan X Ay	5	2.3197	0.46395	5.6679	0.028372	*
Alan X Ay X Karapas uzunluğu X Kondisyon Faktörü	1	0.6054	0.60539	7.3957	0.034665	*

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

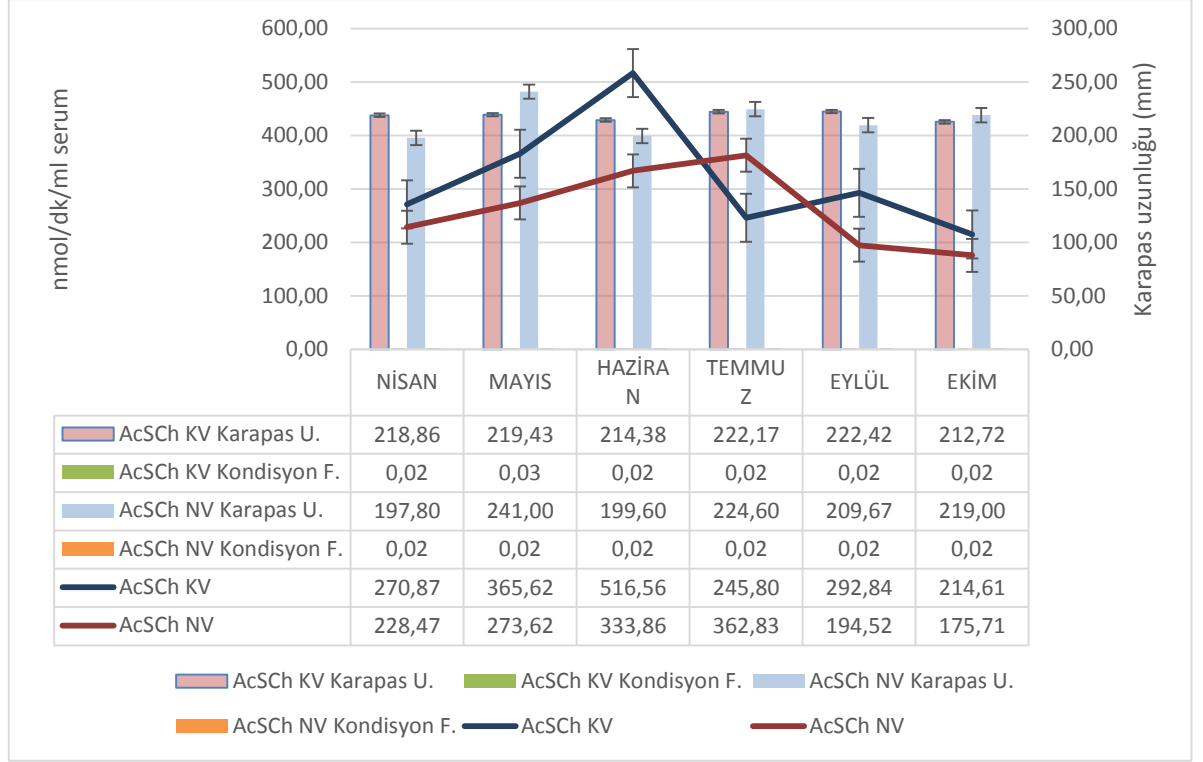
\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0,01$

İstatistiksel analizlere göre ChE enziminin AcSCh substratı ile etkileşimi incelendiğinde, “ay” faktörünün yüksek derecede ( $p < 0,01$ ) önemli olduğu öne çıkmaktadır. Aynı şekilde alan X ay faktörüne bakıldığında da, Nar Vadisi’ndeki kara kaplumbağalarının ChE enzimi aktivitelerini özellikle Temmuz ayına doğru istatistiksel olarak önemli olan ( $p < 0,05$ ) artış saptanmıştır (Şekil 3.9.).



Şekil 3.9.: Alanlara göre Kolinesteraz & Asetiltiyokolin iyodid etkileşimi

Bununla beraber Alan X Ay X Karapas uzunluğu X Kondisyon faktörünün birarada etkileşiminin de istatistiksel olarak Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi bireyleri arasında ChE–AcSCh etkileşiminin anlamlı bir farkı ortaya koyduğu saptanmıştır. Karapas uzunluğunun artması yaz döneminde bu etkileşimin artmasında ( $p < 0,05$ ) önem düzeyinde etkili olmuştur (Şekil 3.10.).



Şekil 3.10.: Alanlara göre Kolinesteraz & Asetiltiyokolin iyodid etkileşiminde karapas uzunluğunun etkisi

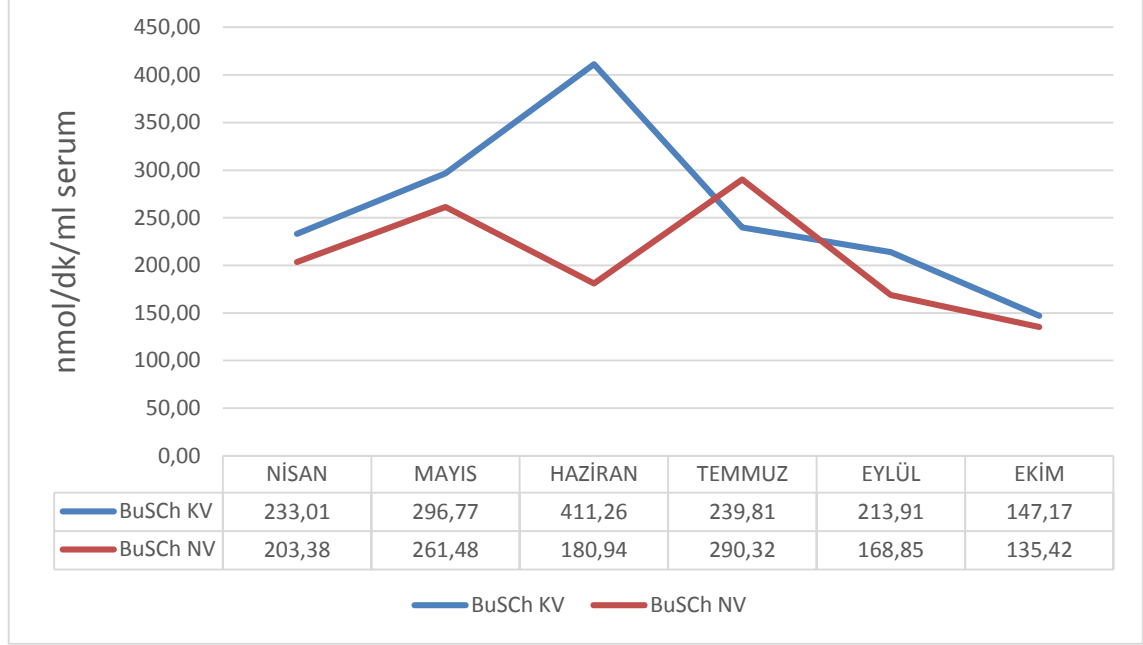
Tablo 3.6.: ChE – BuSCh etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler

BuSCh için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	0.68898	0.68898	6.6814	0.04150	*
Ay	5	3.15748	0.63150	6.1239	0.02372	*
Alan X Ay	5	2.42940	0.48588	4.7118	0.04288	*

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*:  $p < 0.05$

ChE ile BuSCh etkileşimi incelendiğinde ise, AlanXAY faktörünün, Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi kara kaplumbağa örnekleri arasında istatistiksel olarak önemli ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur (Tablo 3.6.).



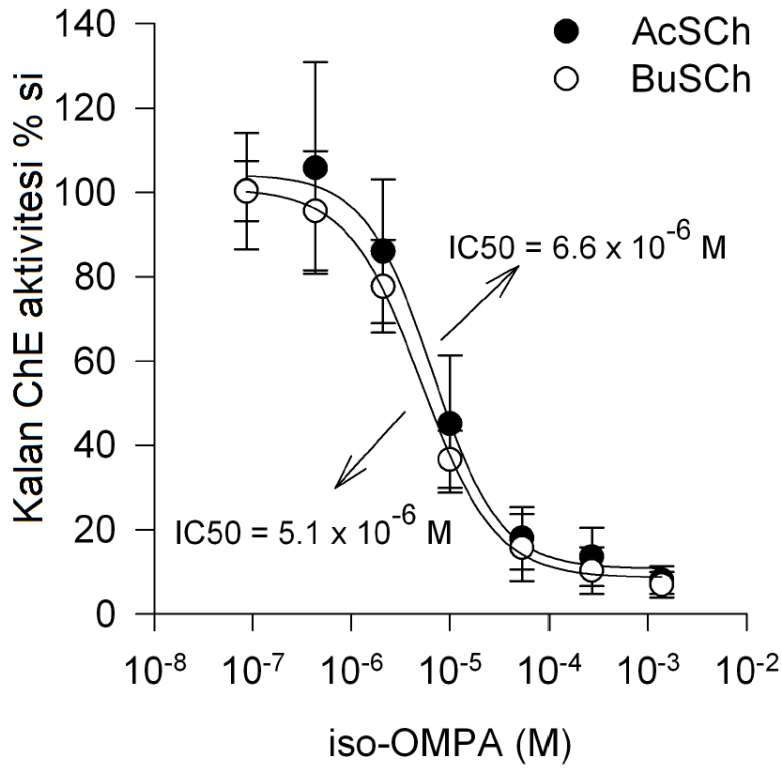
Şekil 3.11.: Alanlara göre Kolinesteraz – Bütiriltiyokolin iyodid etkileşimi

Şekil 3.11 incelendiğinde Kaplumbağa vadisi bireylerinin Haziran ayında yüksek ChE–BuSCh aktivitesi etkileşimi gösterdikleri, Nar vadisi bireylerinin ise özellikle Temmuz ayında enzim aktivitesinde anlamlı bir artış gösterdiği saptanmıştır. Sonrasında her iki bölgede de enzim aktivitesinde düşme tespit edilmiştir.

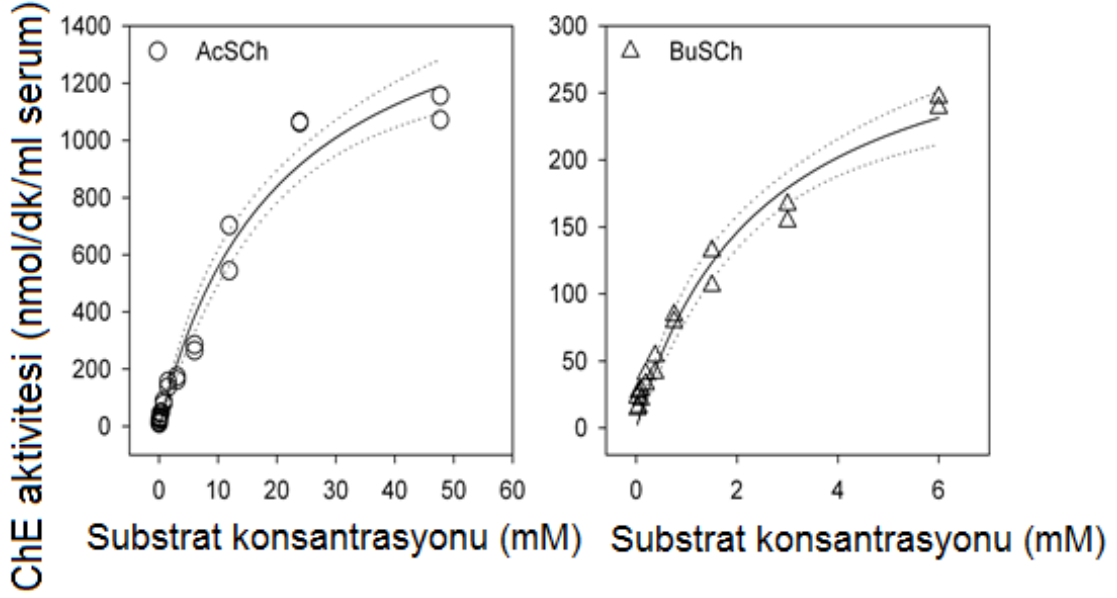
Daha sonra kolinesteraz enziminin substrat tercihinin belirlenebilmesi için *in vitro* olarak, iso – OMPA ile etkileşime sokulmuştur. Iso–OMPA bir BChE inhibitörüdür ve hem AcSCh hem de BuSCh ile reaksiyona girebilir.

Tablo 3.7.: iso-OMPA'nın substratların ChE enzim aktivitesi üzerine etkisi

iso OMPA (M)	Asetiltiyokolin iyodid	Bütiriltiyokolin iyodid
kontrol	%	%
1,38E-03	8,06	7,43
2,70E-04	13,53	4,95
5,40E-05	17,96	8,42
1,00E-05	45,10	33,66
2,10E-06	86,05	66,01
4,30E-07	105,77	88,45
8,60E-08	100,35	88,94



Şekil 3.12.: iso-OMPA'nın artan konsantrasyonunun substratların ChE enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 3.13.: AcSCh ve BuSCh in katalitik etkinliği

$K_m$  değerleri AcSCh için 20,6 mM ve BuSCh için 2,5 mM iken,  $V_{maks}$  değerleri de AcSCh için 1703 nmol/dk/ml serum ve BuSCh için 326 nmol/dk/ml serumdur. Dolayısıyla katalitik etkinlik ( $V_{maks}/K_m$ ) değeri olarak, BuSCh öne çıkmıştır (Şekil 3.13.).

Sonuçlar *in vitro* olarak iso-OMPA'nın artan konsantrasyonu ölçüsünde ChE aktivitesini düşürdüğü hem AcSCh hem de BuSCh substratlarının varlığında gösterilmiştir (Şekil 3.11.). Bu durum Kanarya Adaları'nda kertenkelelerle (*Gallotia galloti*) yapılan çalışma sonuçlarına benzerdir [125]. AcSCh'in iso – OMPA varlığında hidroliz edebilme oranı ( $6,6 \cdot 10^{-6}$  M), BuSCh'inkine ( $5,1 \cdot 10^{-6}$  M) kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Tablo 3.7 ve Şekil 3.12).

Bu çalışmada ChE enziminin substratları olan AcSCh ve BuSCh ile yapılan analizlere göre alan ve ay gibi faktörler substrat-enzim etkileşiminde farklılığa neden olduğu saptanmıştır. Örneğin ChE'ı AcSCh ile değerlendirmeye alındığında bir antikolinerjik etkiyi salt "alan" faktörü ile hesaba katılması istatistiksel olarak anlamlı değilken ( $p < 0,05$ ), "ay" faktörünün yüksek derecede anlamlı olması ( $p < 0,01$ ), bu enzimin zamana bağlı değerlendirilmesinde AcSCh'in etkili bir substrat olduğu sonucuna ulaşabiliriz (Tablo 3.5.). Bu enzim aktivitesi açısından "alan X ay" faktörüyle de Kaplumbağa Vadisi ve Nar Vadisi bireylerinin enzim aktivitelerinde istatistiksel ( $p < 0,05$ ) düzeyinde anlamlı bir farkın

olduğu da ortaya çıkarmaktadır. Canlının bireye zɡu olan karapas uzunluğu ve kondisyon faktoru değerleri de gruplar arası enzim aktivite farkını açıklamada bu substrat için kullanılmıştır (şekil 3.9.). Özellikle domates, yeşil biber gibi sebzelerin zarar görmemesi için 1-15 Temmuz tarihleri arasında Nar Vadisi'nde Chlorpyrifos uygulaması, Nar Vadisi bireylerinin Temmuz ayına doğru enzim aktivitelerindeki arttırıp, kara kaplumbağalarında subletal etki direncini yksetmiş olabilir. Sonrasında her iki bölgedeki dşuşu'n nedeni de canlının biyolojisi gereği aktivitelerini azaltma ile açıklanabilir.

Diğer taraftan BuSCh ile yapılan çalışmalar ise salt "alan" ve "ay"la beraber, "alan X ay" sonuçlarının da istatistiksel açıdan anlamlı ( $p < 0,05$ ) farklılıklar ortaya çıkardığını göstermektedir (Tablo 3.6.). Bu substrat genel çerçevede alandaki organik fosfat kirliliğinde kolinesteraz enzim aktivitesi üzerinde AcSCh ile benzer bir rntu gösterir. Daha önce açıklanan iso-OMPA varlığındaki hidroliz yeteneğinin dşuk olmasına rağmen serum BChE enziminin, BuSCh'a affinitesinin yüksek olması nedeniyle, "alan X ay" etkileşimini değerlendirmede daha yararlı olacağı ortaya çıkmaktadır. Alanda chlorpyrifos uygulaması, Nar Vadisi kara kaplumbağalarının Temmuz ayında enzim aktivitelerini arttırmasıyla sonuçlanmıştır.

Genel olarak ChE ile bu substrat etkileri değerlendirildiğinde ;

- 1) Hayvandan beyin gibi organlar alınmadığı için AChE lulememiş, sadece kan örnekleri üzerinden yürütülen çalışmada serum BChE hedef olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarla kıyaslandığında, hedef biyobelirtecini BChE olduğu saptanmıştır [48;125-127]. Böylece canlıya zarar vermeden alınan kan örneklerinden yapılan incelemelerde istenen sonuçlar alınmıştır.
- 2) Kara kaplumbağalarında AcSCh, BuSCh'a göre mevsimsel değerlendirmeyi yansıtma da daha etkili bir substrattır. Ancak alan bileşeni de dahil edilerek, genel kompozisyonu doğru yorumlayabilmek için affinitesi yüksek olan BuSCh tercih edilmiştir. Nitekim kertenkelelerde (*Gallotia galloti*) hem alan hem de laboratuvar çalışmalarında da benzer sonuçlar ortaya konmuştur [48;125].
- 3) Ağustos ayında geçen ağır estivasyon sürecinde bir değer elde edilememiş olsa da, takibindeki Eylül ve Ekim aylarında aktivitelerini

indirgemeleri ve yeni bir insektisit uygulamasının olmaması, kolinesteraz enziminin aktivitesinin azalmasına neden olmuştur. Pestisit varlığı temel seviyeyle konu değerlendirildiğinde, Kaliforniya'da (ABD) tatlısu kaplumbağası (*Emys marmorata*) populasyonlarından pestisit kaynağından kademeli olarak uzak mesafelerden alınan örneklerden, uzaklaşmayla uyumlu olarak enzim aktivitesinin düşmesi, yaptığımız bu çalışmayla örtüştüğünü belirtmek olanaklıdır [128].

- 4) Kondisyon faktörünün, örneklem dönemiyle uyumlu olması beslenme rejimiyle kolinesteraz enzimi arasındaki örüntünün açıklanması bakımından anlamlıdır. Bu sayede gerek karapas uzunlukları gerekse de vücut ağırlıklarını, beslenerek artıran kara kaplumbağaları için tek başlarına bu faktörler istatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de, "Alan X Ay X Kondisyon Faktörü" matrisinde enzim aktivitesini etkileyebildiği ortaya konmuştur. Söz konusu ilişki tatlısu balıkları ve kertenkelelerdeki örüntüyle uyumludur [48;130].

Kolinesteraz enzim aktivitesindeki dalgalanmayı etkileyebileceği düşünülen diğer faktörler olarak eşey tipi, kene varlığı ve meteorolojik koşullarda muhtemel bir ekstrem durum gibi koşullar da sınanmış ancak bu veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kolinesteraz enzim aktivite çalışmaları, kara kaplumbağaları (*Testudo graeca*) üzerine yaptığımız çalışmanın sonuçları, akçıl gözlü balık (*Stizosteidon vitreum*) ve tatlısu kaplumbağası (*Emys marmorata*) ile yapılan çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir [128;130].

### **3.2.1.2. Karboksilesteraz enzim aktivitesi sonuçları**

Karboksilesteraz (CbE) pestisit detoksifikasyonunda önemli enzimlerdendir. Bu esterazlar, bazı böceklerde pestisit direnci için biyokimyasal mekanizmalarda rol alsa da, sonrasında balık, sürüngen ve memelilerde de organik fosfatlı pestisitlerden kaynaklanan toksisite için etkili bir koruma mekanizması olduğu düşünülmüştür [74;131;132]. Karboksilesteraz aktivitesinin belirlenmesi ChE aktivitesine kıyasla daha hassas bir belirteç olabileceği de kimi araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır [69].

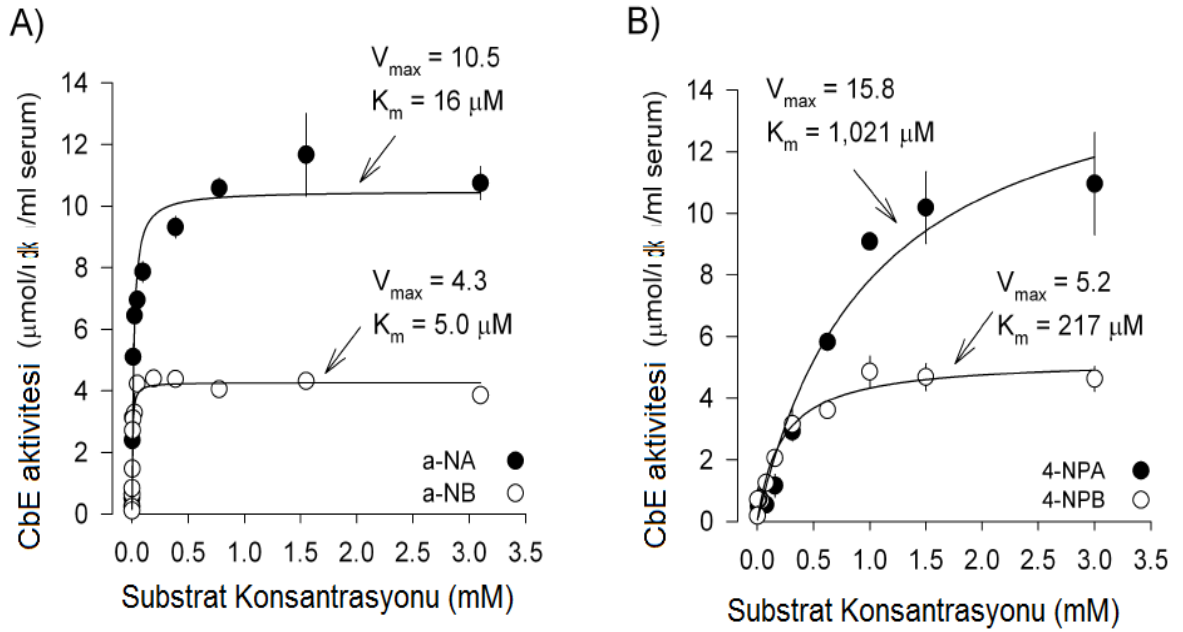
CbE enziminin 1-NA (1–Naftil Asetat), 1-NB (1–Naftil Bütirat), 4-NPA (4–Nitrofenil Asetat) ve 4-NPB (4 – Nitrofenil Bütirat) substratları ile etkileşimleri ölçülmüştür (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8.: Farklı substratlar ve konsantrasyonları ile CbE enziminin etkinliği

Substrat Konsantrasyonu (mM)	1-NA	1-NB	4-NPA	4-NPB
3,1	10,750	3,858	10,957	4,624
1,55	11,667	4,317	10,186	4,686
0,775	10,583	4,058	9,081	4,857
0,3875	9,317	4,383	5,819	3,614
0,19375	7,867	4,400	2,919	3,152
0,0484375	6,950	4,233	1,162	2,052
0,02421875	6,450	3,283	0,543	1,248
0,012109375	5,100	3,092	0,662	0,681
0,006054688	3,133	2,717	0,486	0,738
0,003027344	2,400	1,475		0,686
0,001513672	0,517	0,642		0,714
0,000756836	0,267	0,842		0,186
0,000378418		0,225		
0,000189209		0,113		

Her bir substrat için kendi grubu içerisinde  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri hesaplanmıştır. Buna göre 1-NA ( $\alpha$ -NA) nın  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri, 1-NB ( $\alpha$ -NB) ninkilere göre ve 4-NPA nın  $K_m$  ve  $V_{maks}$  değerleri de, 4-NPB ninkilere göre yüksek bulunmuştur (Şekil 3.14.).





Şekil 3.14.: Farklı substrat ve konsantrasyonlarının CbE aktivitesine etkisi

Naftil esterler (1-NA ve 1-NB) nin katalitik aktivitelerinin de nitrofenil esterlere (4-NPA ve 4-NPB) göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

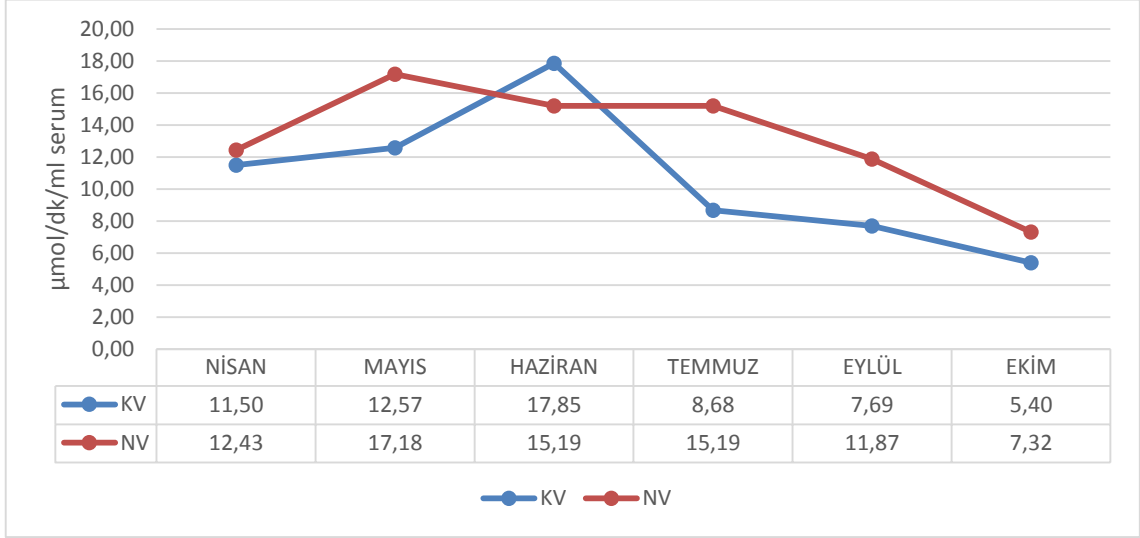
Tablo 3.9.: 1-NA - CbE etkileşimini değerlendirmede kullanılan etkili faktörler

1 – NA için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	2.6895	2.68948	18.9814	0.004787	**
Ay	5	7.6261	1.52523	10.7645	0.005889	**
Alan X Ay	5	4.2032	0.84063	5.9329	0.025537	*
Karapas uzunluğu	1	0.9284	0.92844	6.5526	0.042920	*
Alan X Ay X Karapas uzunluğu	3	3.7602	1.25339	8.8460	0.012730	*

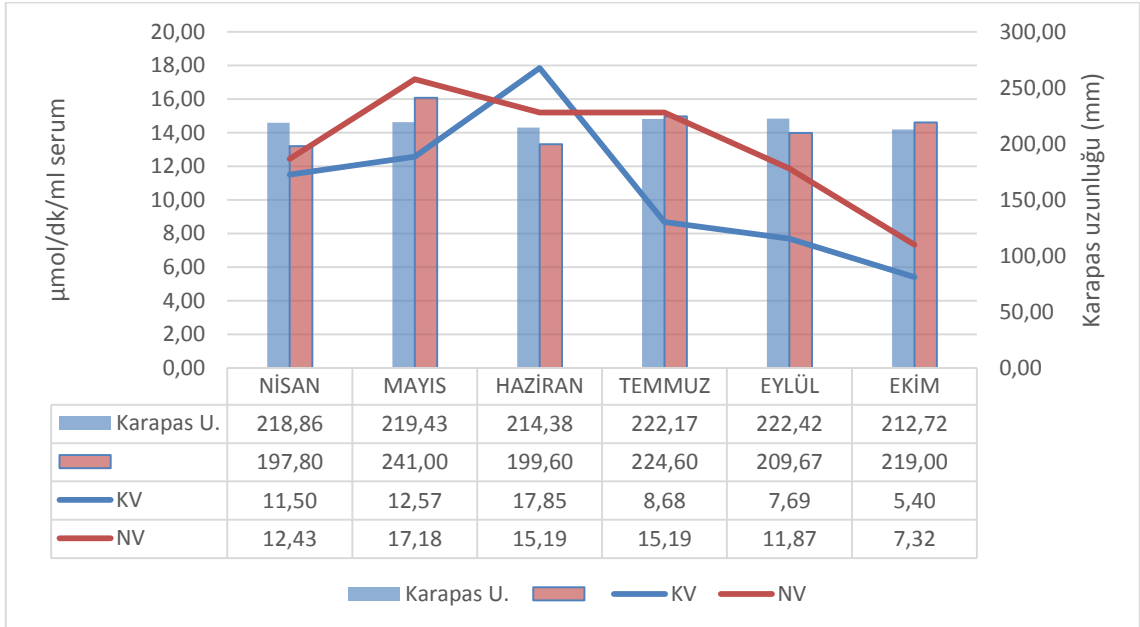
Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0,01$

İstatistiksel analizlere göre, CbE ile 1-NA etkileşimi yalnız başlarına “Alan” ve “Ay” faktörü gruplar arası yüksek derecede önemli ( $p<0,01$ ) farklılıklar gösterirken (Tablo 3.9.), bu iki faktörün birlikte değerlendirildiğinde de iki grup arasında anlamlı derecede ( $p<0,05$ ) farklı olduğu saptanmıştır (Şekil 3.15.). Bu farklılığı desteklemede karapas uzunluğunun da etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Şekil 3.16.). Sonuç olarak CbE enziminin alansal ve zamansal olarak etkisini incelemede 1-NA substratı daha uygundur.



Şekil 3.15.: CbE & 1-NA etkileşiminin aylara göre ölçülen değerleri



Şekil 3.16.: Aylara göre alanlardaki CbE & 1-NA etkileşimini değerlendirmede karapas uzunluğunun etkisi

Nar Vadisi'nde artan karapas uzunluğunun etkisi ile beraber, Temmuz ayı CbE aktivitesinde (15,19  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ), Kaplumbağa Vadisi'ne kıyasla (8,68  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ) iki kat yüksek bulunmuştur (Şekil 3.15.).

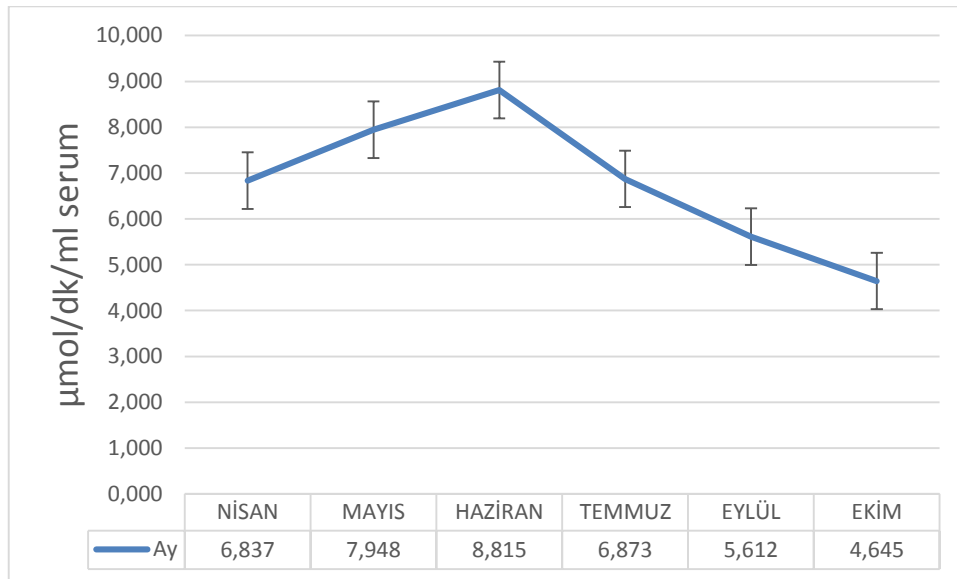
Tablo 3.10.: 1-NB - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler

1 – NB için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	0.0144	0.01442	0.2311	0.647760	
Ay	5	3.5034	0.70067	11.2258	0.005281	**

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*\* :  $p < 0,01$

Yukarıdaki analiz sonuçlarından görüldüğü üzere CbE enzimi, 1-NB substratı ile etkileşime tabi tutulduğunda “alan” faktörünün anlamlı derecede önemli olmadığı ortaya çıkmıştır ( $p > 0,05$ ) (Tablo 3.10.). Ancak 1-NB substratı ile CbE enziminin etkileşimi “ay” faktörü istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0,01$ ) (Tablo 3.10.) (Şekil 3.17.). Özellikle Haziran ayı en yüksek etkileşime sahipken (8,815  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ), Ekim ayı en düşük seviyeye sahiptir (4,645  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ) (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17.: Aylara göre alanlardaki CbE & 1-NB etkileşimi

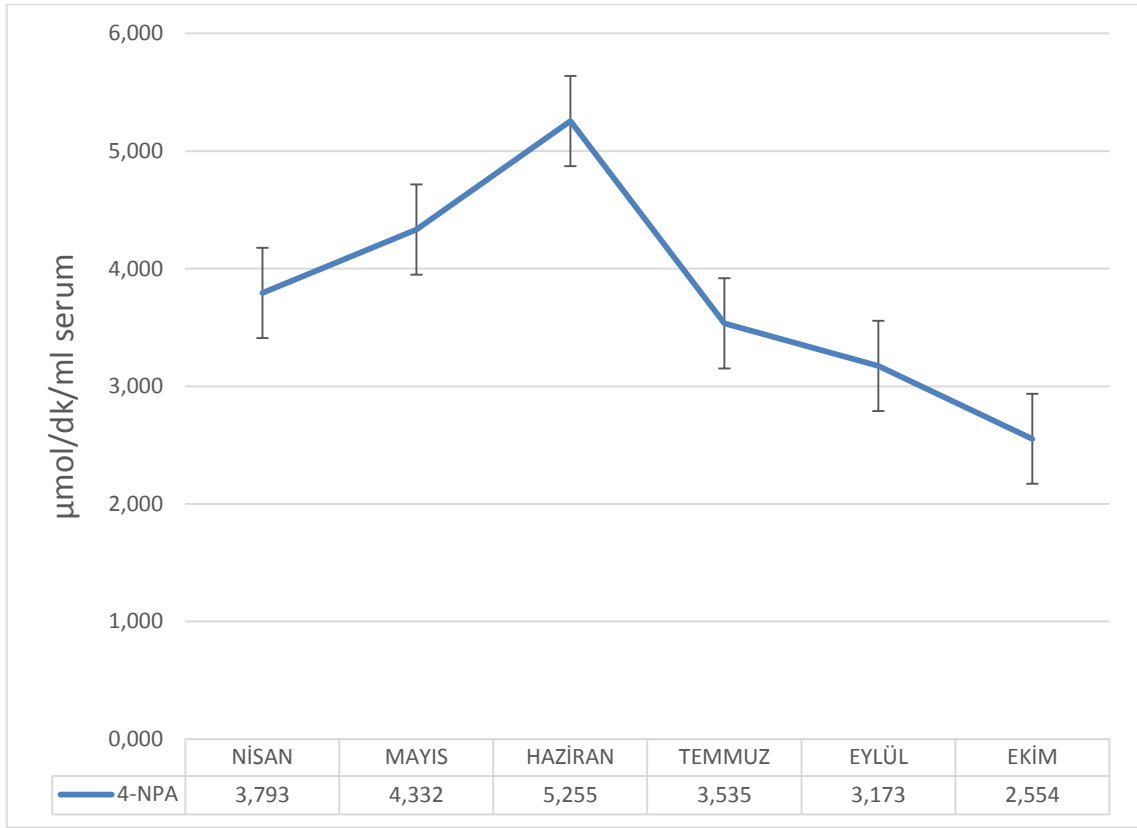
Tablo 3.11.: 4-NPA - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili olan faktörler

4 – NPA için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	0.5478	0.54777	3.9878	0.09282	
Ay	5	4.0002	0.80005	5.8244	0.02665	*

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*p<0.05

Bu analiz sonuçlarından görüldüğü üzere CbE enzimi, 4-NPA substratı ile etkileşime tabi tutulduğunda “alan” faktörü anlamlı değildir (p>0,05) (Tablo 3.11.). Ancak 4-NPA substratı ile CbE enziminin etkileşimi “ay” faktörü anlamlıdır (p<0,05) (Tablo 3.11.) (Şekil 3.18.). Özellikle Haziran ayı en yüksek etkileşime sahipken (5,255  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ), Ekim ayı en düşük etkileşime sahiptir (2,554  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ) (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18.: Aylara göre alanlardaki CbE & 4-NPA etkileşimi

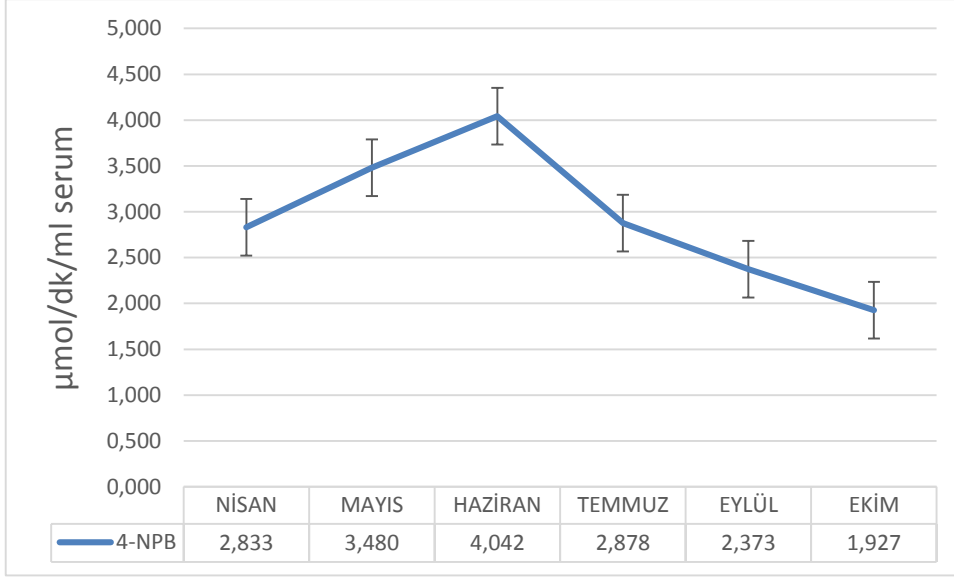
Tablo 3.12.: 4-NPB - CbE etkileşimini değerlendirmede etkili faktörler

4 – NPB için	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	0.1898	0.18984	1.8680	0.220702	
Ay	5	4.9767	0.99535	9.7940	0.007509	**

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*\* :  $p < 0,01$

CbE enzimi, 4-NPB substratı ile etkileşime tabi tutulduğunda ise “alan” faktörü anlamlı derecede önemli değildir ( $p > 0,05$ ) (Tablo 3.12.). Ancak 4-NPB substratı ile CbE enziminin etkileşimi “ay” faktörü anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,01$ ) (Tablo 3.12.) (Şekil 3.19.).



Şekil 3.19.: Aylara göre alanlardaki CbE & 4-NPB etkileşimi

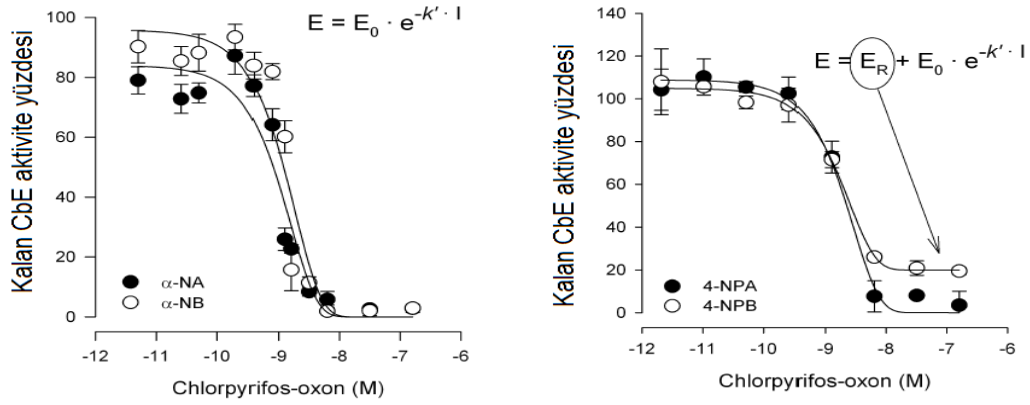
Özellikle Haziran ayı en yüksek etkileşime sahipken (4,042  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ), Ekim ayı en düşük etkileşime sahiptir (1,927  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ) (Şekil 3.19.).

Karboksilesteraz enzim aktivitesi üzerinde organik fosfatlı pestisitlerin etkinliğini gösterme amacı ile yapılan *in vitro* Chlorpyrifos – okson deney sonuçları Tablo 3.13 te gösterilmiştir.

Tablo 3.13.: *in vitro* Chlorpyrifos – okson farklı konsantrasyonlarda uygulanmasının CbE aktivitesi üzerine etkisi

<b>Chlorpyrifos-okson</b>						
	$\alpha$ -NA	$\alpha$ -NB		4-NPA		4-NPB
Son [M]	%	%	Son [M]	%	Son [M]	%
0			0		0	
1,00E-12	77,61	88,35	2,05E-12	104,28	2,03E-13	106,00
5,00E-12	79,01	90,25	1,02E-11	110,24	1E-12	109,06
2,55E-11	72,80	85,45	5,12E-11	105,56	5E-12	109,96
5,00E-11	74,80	88,24	2,56E-10	102,54	2,55E-11	101,61
1,97E-10	87,22	93,45	1,28E-09	72,76	1,26E-10	99,88
2,55E-10	63,41	94,14	6,4E-09	7,63	6,32E-10	100,59
3,95E-10	77,21	83,94	3,2E-08	8,03	3,16E-09	96,24
7,89E-10	64,16	81,92	1,6E-07	6,33	1,6E-08	92,39
1,26E-09	25,94	60,17	8E-07	5,89	4E-08	75,29
1,61E-09	22,73	15,73	0,000004	8,57	8E-08	58,63
3,16E-09	8,44	11,42	0,00002	11,65	1,97E-07	5,82
6,32E-09	5,88	1,91			3,95E-07	3,84
3,16E-08	2,66	2,05			0,000002	3,22
1,61E-07	2,88	2,97			0,00002	2,20
7,89E-07	5,62	3,81				
3,95E-06	4,36	3,18				
2,00E-05	5,91	4,59				

Chlorpyrifos-okson ile yapılan *in vitro* deneylerde, CbE enziminin 1-NA nın, 1-NB substratına göre ve 4-NPA nın da, 4-NPB substratından daha düşük konsantrasyonlarda inhibisyona neden olduğu ortaya konmuştur (Tablo 3.13.) (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20.: *in vitro* Chlorpyrifos-okson'un artan substrat konsantrasyonunun CbE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Karboksilesteraz enzim aktivitesi üzerinde organik fosfatlı pestisitlerin etkinliğini gösterme amacı ile yapılan bir diğer *in vitro* olarak Carbaryl uygulaması ile elde edilen deneyleri sonuçları Tablo 3.14 te gösterilmiştir.

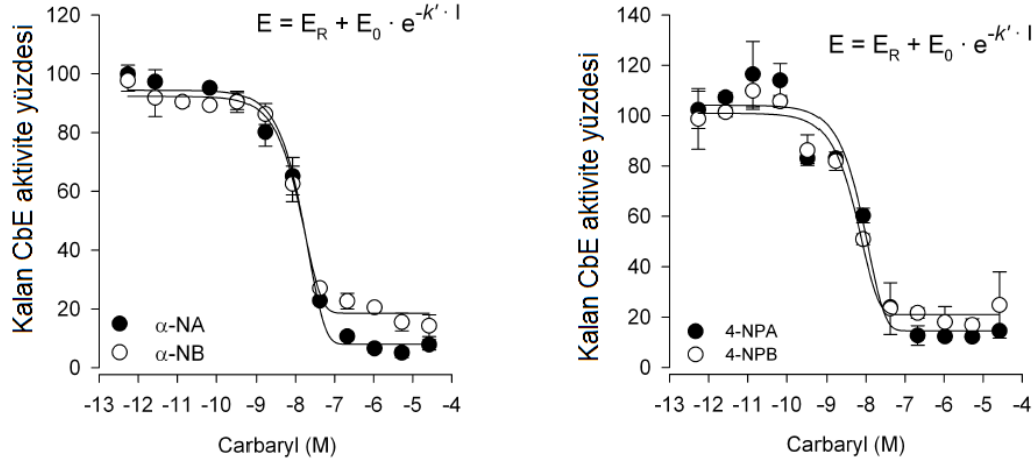
Tablo 3.14.: *in vitro* carbaryl uygulaması

Carbaryl				
$\alpha$ -NA		$\alpha$ -NB	4-NPA	4-NPB
Son [M]	%	%		%
0				
5,39E-13	99,85	97,73	102,35	98,68
2,69E-12	97,33	91,86	107,26	101,37
1,35E-11	87,27	90,51	116,45	109,86
6,74E-11	95,24	89,34	114,03	105,64
3,37E-10	90,67	90,51	83,05	86,28
1,68E-09	80,22	86,31	83,05	81,91
8,42E-09	65,21	62,55	60,26	50,91
4,21E-08	22,79	27,08	23,93	23,37
2,11E-07	10,64	22,67	12,68	21,65
1,05E-06	6,56	20,49	12,32	17,99
5,26E-06	5,05	15,53	12,18	16,87
2,63E-05	7,80	14,27	14,53	24,80

Benzer bir biçimde uygulanan diğer *in vitro* testte ise CbE enzimi, yukarıda sözü edilen 4 substrat ile carbaryl varlığında etkileşime tabi tutulmuştur. Sonuçta da,



1-NA ve 1-NB ile 4-NPA ve 4-NPB nin kendi grupları içerisinde birbirine benzer yanıtlar verdiği ortaya çıkmıştır (Şekil 3.21.). Genel çerçevede ise, 4-NPB nin CbE ile etkileşimi, diğer substratlara nazaran daha duyarlı bulunmuştur (Tablo 3.14.).



Şekil 3.21.: *in vitro* carbaryl'in artan her iki substrat konsantrasyonunun CbE enzim aktivitesi üzerine etkisi

Bu bağlamda her iki alandan elde edilen kan örnekleri 4 farklı substrat (1-NA, 1-NB, 4-NPA ve 4-NPB) ve *in vitro* olarak 2 pestisit (chlorpyrifos – okson ve carbaryl) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar;

- 1) Naftil esterler (1-NA ve 1-NB) in katalitik aktivitelerinin de nitrofenil esterlere (4-NPA ve 4-NPB) göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 3.14.). Esteraz enzim inhibisyonu ve organik fosforlu model eşitliklere göre çıkarılan bu durum, Tegu kerkenkesindeki (*Tupinambis merianae*) CbE ve seçici substratlar arasındaki durumla paralel bir sonuç bulduğumuzu gösterir [126;133].
- 2) CbE enzim aktivitesinin değerlendirildiği 4 substrattan hem “alan” hem de “ay” faktörleri için önemli derecede anlamlı bulunması ( $p < 0,01$ ) bakımından 1-NA daha önemli bulunmuştur (Tablo 3.9.). Ayrıca diğer substratlar “alan” faktörü bakımından “seçicilik” sağlayamazken, bir naftil esteri olan 1-NA “alan X ay” faktörü bakımından da istatistiksel olarak önemli bir substrattır (Şekil 3.15., Şekil 3.16.). Bu çerçevede CbE ile 1-NA substratı ele alındığında, Nar vadisi kara kaplumbağalarının

hibernasyondan çıkışla beraber, Kaplumbağa vadisindeki bireylere kıyasla yüksek bir aktivite gösterdiği ortaya çıkmaktadır (Şekil 3.16.). Bu duruma Nar vadisinde üzüm için Nisan ayı ile elma için Mayıs ayında kullanılan insektisitlerin (deltamethrin ve chlorpyrifos) neden olduğu söylenebilir. Kara kaplumbağalarının gösterdiği bu reaksiyon, canlının yaşadığı ortamda gerek bitki yapraklarını tüketmeleri gerekse de Nar Vadisindeki dar bölgede aktivitelerini sürdürmesi nedeni ile, etken maddeden uzaklaşamadıklarından ötürü anlamlıdır [127;128]. Ayrıca sıçanlarla yapılan esteraz çalışmalarında da 1-NA substratı “seçiciliği” bakımından öne çıkan bir substrattır [77].

- 3) Karapas uzunluklarını beslenerek artıran kara kaplumbağaları için tek başına bu faktör istatistiksel olarak kritik bir anlam ifade etmeye çok yakın olsa da ( $p \cong 0,05$ ) “Alan X Ay X Karapas uzunluğu” matrisinde enzim aktivitesini etkileyebildiği ortaya konmuştur. Mayıs ve Temmuz aylarında Nar Vadisi bireylerinin, Kaplumbağa Vadisi bireylerinin boylarını yakalaması ve hatta geçmesi bu matrisi anlamlı hale getirmiştir. Söz konusu ilişki tatlısu balıkları ve kertenkelelerdeki boy uzunluğu örüntüleriyle uyumludur [48;130]. Ancak Tegu kertenkelesinde vücut uzunluğu ile hiçbir korelasyon göstermediği bildirilmektedir [126].
- 4) 1-NB, 4-NPA ve 4-NPB’den zamansal değişim olarak bütirat tipte olanlar (1-NB ve 4-NPB) üzerinden değerlendirme yapmak, asetat tipte (4-NPA) olana göre istatistiksel olarak daha anlamlıdır ( $p_1 < 0,01$ ;  $p_2 < 0,05$ ) (Şekil 3.17., Şekil 3.18., Şekil 3.19.). Ayrıca katalitik etkinlikleri bakımından CbE lerin substratları ile olan ilişkisi sıralandığında bütiratların, asetatlara kıyasla yüksek olması, 4-NPB ve 1-NB in enzim etkinliği bakımından genel aylık dalgalanmasında işe yarar bilgiler sunar. Bu durum toprak solucanları (*Lumbricus terrestris*) ile yapılan çalışmada organizmanın doku homojenatları ve toprak ekstraktlarındaki etkileşimle paralellik göstermektedir [131].
- 5) Tıpkı Tegu kertenkelesinin vermiş olduğu yanıtta olduğu gibi kara kaplumbağası CbE enzimi her 4 substratla , etkileşim matrisinde eşey tipi, kene varlığı gibi faktörlerle de analiz edilmiş olsa da, bu faktörlerle hiçbir kayda değer etkileşim bulunamamıştır [126]. Ancak *B.buteo*, *C.coturnix japonica*, *Turdus grayi* gibi kuşlarda CbE aktivitesi ile tarımsal kimyasallar

arasındaki etkileşimde cinsiyet, yaş gibi faktörlerin etkisinin önemli olduğu ifade edilmektedir [135].

- 6) *In vitro* olarak chloropyrifos – okson ve karbaril varlığında, CbE enziminin substratlarla olan ilişkisi sigmoidal bir model olarak ortaya çıkar. Ancak hem chloropyrifos – okson hem de karbaril varlığında CbE nin naftil esterlerle olan etkileşiminde bir tolerans söz konusu iken, nitrofenil esterlerle olan etkileşiminde bir direnç söz konusudur (Şekil 3.20., Şekil 3.21.). Bütüncül yaklaşımla hem carbaryl hem de chloropyrifos için serum CbE'nda açıkça katalitik olmayan detoksifikasyon mekanizmaları rol oynar denilebilir. Bu durum yer solucanları ve Tegu kertenkeleleri ile yapılan *in vitro* çalışmalara benzerlik göstermektedir [126;131].

Geçmiş çalışmalar, CbE aktivitesinin omurgasız hayvanların lipit metabolizmasında kayda değer rolleri olduğunu belirtmektedir [129;134;135]. Benzer bulgular yağca zengin besinlerle beslenen sıçan ve farelerde de rapor edilmiştir [138; 139]. Ayrıca CbE nin trigliserol hidrolaz aktivitesiyle memelilerin çeşitli dokularında doğal yağ metabolizmasında rol alması, kara kaplumbağaları gibi hibernasyon adı altında uzun dönemli inaktif dönemlere sahip canlılarda CbE nin aktivitesi üzerine elde ettiğimiz bu veriler daha anlamlı olabilir [140]. Zira hibernasyondan çıkış dönemi enzim aktivitesi (Nisan ayı CbE – 4NPB aktivitesi: 2,833  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ), hibernasyona giriş dönemine (Ekim ayı CbE – 4NPB aktivitesi: 1,927  $\mu\text{mol/dk/ml}$ ) göre daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.19.). Diğer substratlarla da etkileşim benzer sonuçlar ortaya koymuştur (Şekil 3.15., Şekil 3.17., Şekil 3.18.).

### **3.2.1.3. Oksidatif stres enzimler enzim aktivitesi sonuçları**

Serbest radikaller, atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron (e-) taşıyan moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stres tetiklemektedir. Temel olarak oksidatif stres, biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır [141]. Her ne kadar biyokimyasal araştırmalarda, oksidatif stres ana konulardan görülse de, insan olmayan organizmalardaki yaşam hikayelerine ilişkin yayınlar halen daha sınırlıdır [80]. Oksidanlar, hedef molekülün yapısını ve fonksiyonunu değiştirerek hücre zarını ve değişik enzimatik olayları etkileyerek hücre hasarına neden olurlar [142].

### **3.2.1.3.1. Glutasyon – S – Transferaz enzim aktivitesi sonuçları**

Kaplumbağa ve Nar vadisi bireylerden elde edilen serumda ölçülen GST enzim aktivitesi aylara, eşeye karapas uzunluğu ve kene varlığına göre değişmektedir. Elde edilen veriler istatistiksel hesaplamalar ile değerlendirilerek tablo 3.15 ile şekil. 3.22, 3.23, 3.24 ve 3.25 te gösterilmiştir. Buna göre, salt “alan” faktörü bakımından iki bölge arası GST aktivitesinde anlamlı farklılıklar olmamasına rağmen, “ay” faktörünün önemli derecede etkisi ( $p<0,01$ ) hesaba katıldığında zamansal farklılık “alan” faktörünü de etkilemiştir ( $p<0,05$ ) şeklinde bir değerlendirme yapılabilir.

Tablo 3.15.: GST enzim aktivitesini değerlendirmede etkili faktörler

GST	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	0.0307	0.03075	0.3062	0.600017	
Ay	5	7.0752	1.41503	14.0907	0.002896	**
Karapas Uzunluğu	1	1.8448	1.84476	18.3699	0.005171	**
Eğey	1	0.6100	0.61003	6.0746	0.038810	*
Alan X Ay	5	3.4336	0.68671	6.8382	0.018279	*
Karapas Uzunluğu X Kene	1	0.7163	0.71627	7.1325	0.036993	*
Alan X Ay X Karapas Uzunluğu	5	3.2049	0.64099	6.3829	0.021528	*
Alan X Ay X Kondisyon Faktörü	5	2.3274	0.46548	4.6352	0.044431	*
Alan X Ay X Kene	1	0.6548	0.65477	6.5201	0.043289	*

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$

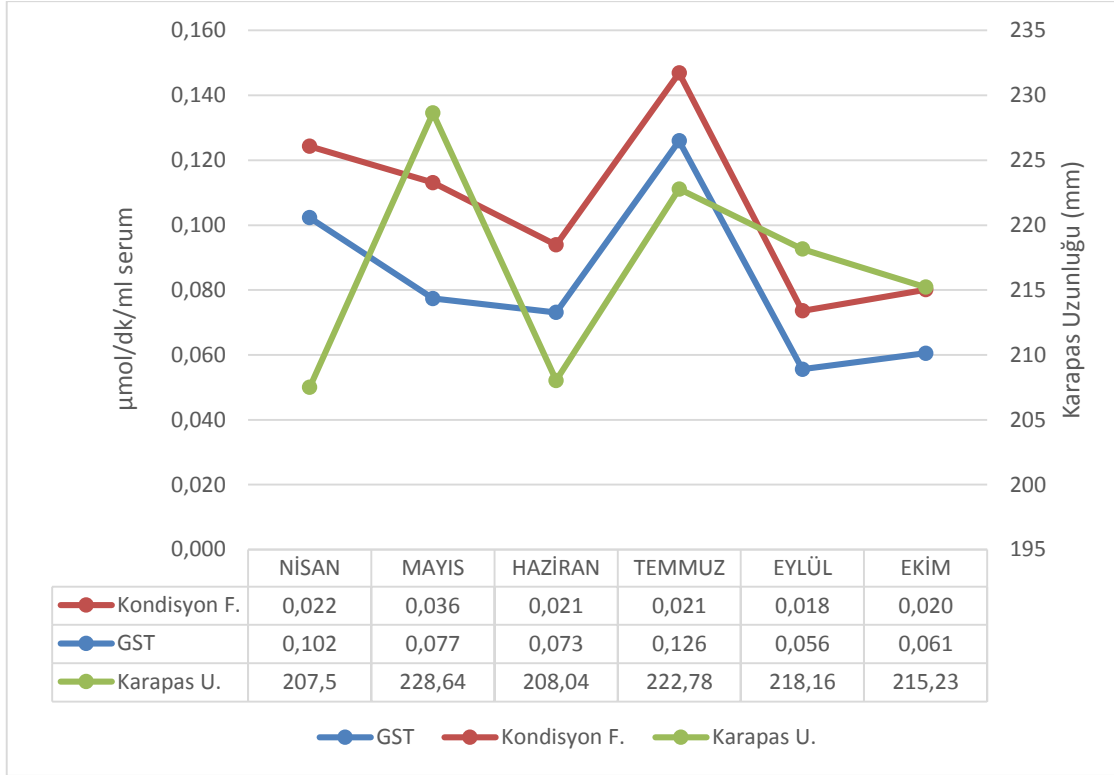
Bu veri örüntüsüne göre, kondisyon faktörü ve karapas uzunluğu gibi bireye özel verilerin istatistik açıdan anlamlı olan önemli etkisi Şekil 3.22.gösterilmektedir.

Şekil incelendiğinde GST enzim aktivitesinin, karapas uzunluğu ve kondisyon faktörü arasında vücut indeks değerlerindeki artışa paralel olarak kirliliğin gözlemlendiği Nar vadisi bireylerinde özellikle Haziran ve Temmuz gibi arttığı görülmektedir.



Şekil 3.22.: Aylara göre her iki alanda GST enzim aktivitesi, karapas uzunluğu ve kondisyon faktörünün birlikte değerlendirilmesi

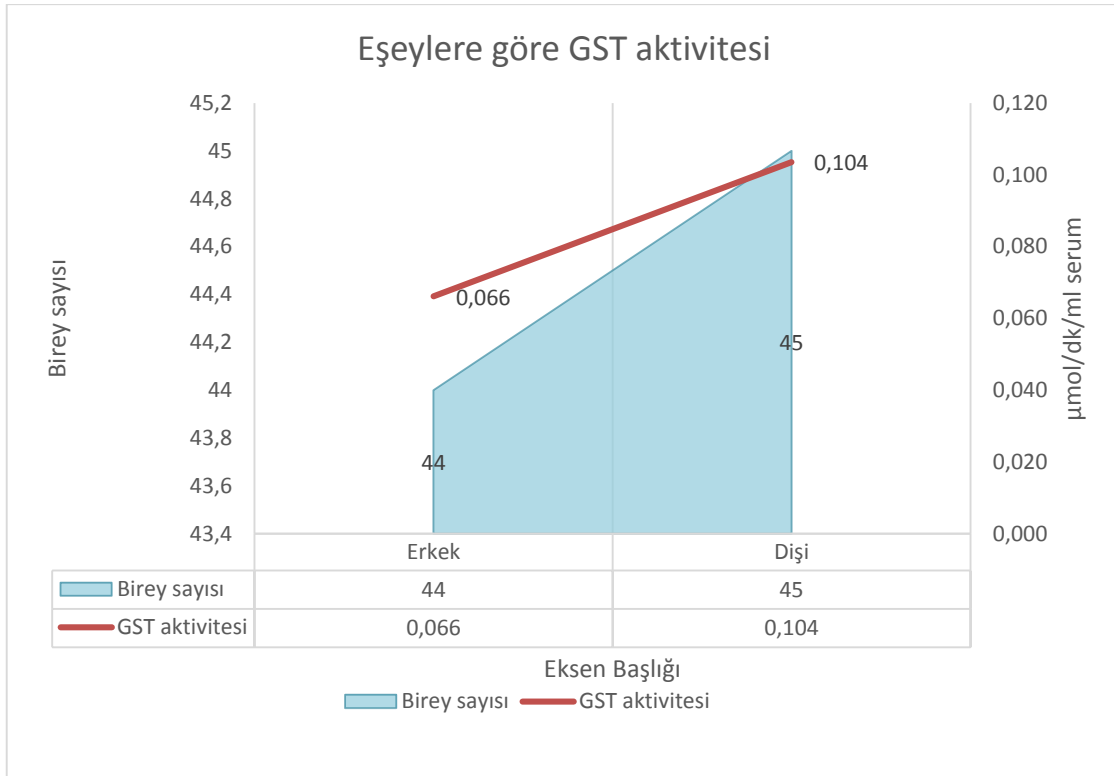
Şekil 3.22 ye göre, Kaplumbağa Vadisi'ndeki bireylerin GST enzim aktivitesinin mevsimsel dalgalanması normal aktivitesine uyumlu seyrederken, Nar Vadisi'nde özellikle Temmuz ayında saptanan artış (0,203) dikkat çekicidir.



Şekil 3.23.: Aylara göre GST aktivitesi ile karapas uzunluğu ve kondisyon faktörü arasındaki ilişkiler

Aylar arasındaki farkın istatistik açıdan yüksek derecede önem göstermesi ( $p < 0,01$ ) nedeniyle her iki bölge bireyleri genel bir mevsimsel örüntüde incelenmiş ve bu dalgalanmada kondisyon faktörü ve karapas uzunluğu arasındaki ilişkiler Şekil 3.23. sunulmuştur. GST enzimin, en yüksek aktivitesi Temmuz ayında ölçülmüş (0,126), en düşük aktivite dönemi ise Eylül (0,056) ve Ekim (0,061) aylarına karşılık gelmektedir.

GST enzim verilerinin toparlandığı tabloya (Tablo 3.15.) dikkat edilecek olursa eşey faktörünün de toplam aktivite performansını değerlendirmede anlamlı ölçüde dikkat çektiği görülmektedir ( $p < 0,05$ ). Buna göre erkek bireylerin GST aktivitesi ortalama 0,066  $\mu\text{mol/dk/ml}$  iken, dişilerde bu değer 0,104  $\mu\text{mol/dk/ml}$  olarak ölçülmüştür (Şekil 3.24.).

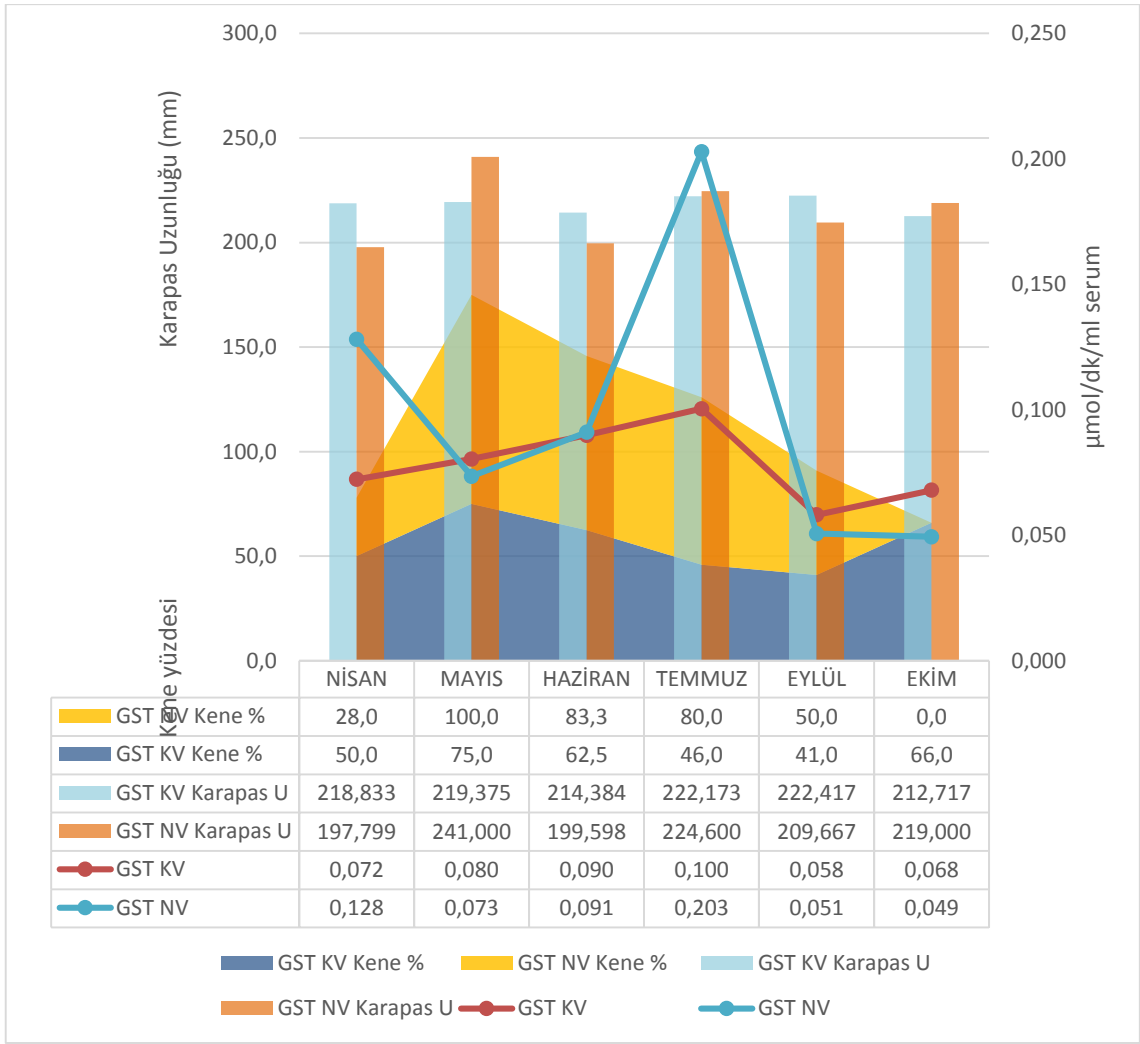


Şekil 3.24.: Eşeylere göre GST aktivitesindeki değişme

Bir diğer faktör olarak ele alınan “kene varlığı” etkisi de GST enzimi için “alan X ay” etkileşimi için anlamlı derecede önemlidir ( $p < 0,05$ ). Özellikle Temmuz ayında Nar vadisi bireylerindeki enzim aktivitesi artışı ile beraber kene bulundurma varlığının (%80), Kaplumbağa vadisine oranla (%46) yüksek oluşu dikkat çekicidir. Bununla beraber, Ekim ayında da Nar vadisi bireylerinde hiç kene tespit edilememişken (%0), Kaplumbağa vadisi bireylerinin %66 sında kene tespit edilmesi önemlidir (Şekil 3.25.).

Bu sonuçlara göre kene taşıyan bireylerin GST enzim aktivitesinin yüksek olduğu ve özellikle Temmuz ayında pestisit etkisiyle birlikte kene varlığının canlıda bir stres oluşturduğunu söyleyebiliriz.





Şekil 3.25.: GST enzim aktivitesine Alan X Ay a göre kene varlığının etkisi

### 3.2.1.3.2. Glutasyon redüktaz enzim aktivitesi sonuçları

GR aktivitesinin ölçümü kofaktörü olan NADPH'ın reaksiyonu ile yapılmıştır. NADPH'ın çeşitli detoksifikasyon mekanizmalarında rol olması hücresel hasarı değerlendirebilmemizi sağlar [80]. GR enzimi aktivitesinin gerek "alan" gerekse de "ay" faktörüne bağlı olarak önemli derecede ( $p < 0,05$ ) farklı olduğu saptanmıştır (Tablo 3.16.). Aynı derecede karapas uzunluğunun da enzim aktivitesini etkilediği görülmektedir.

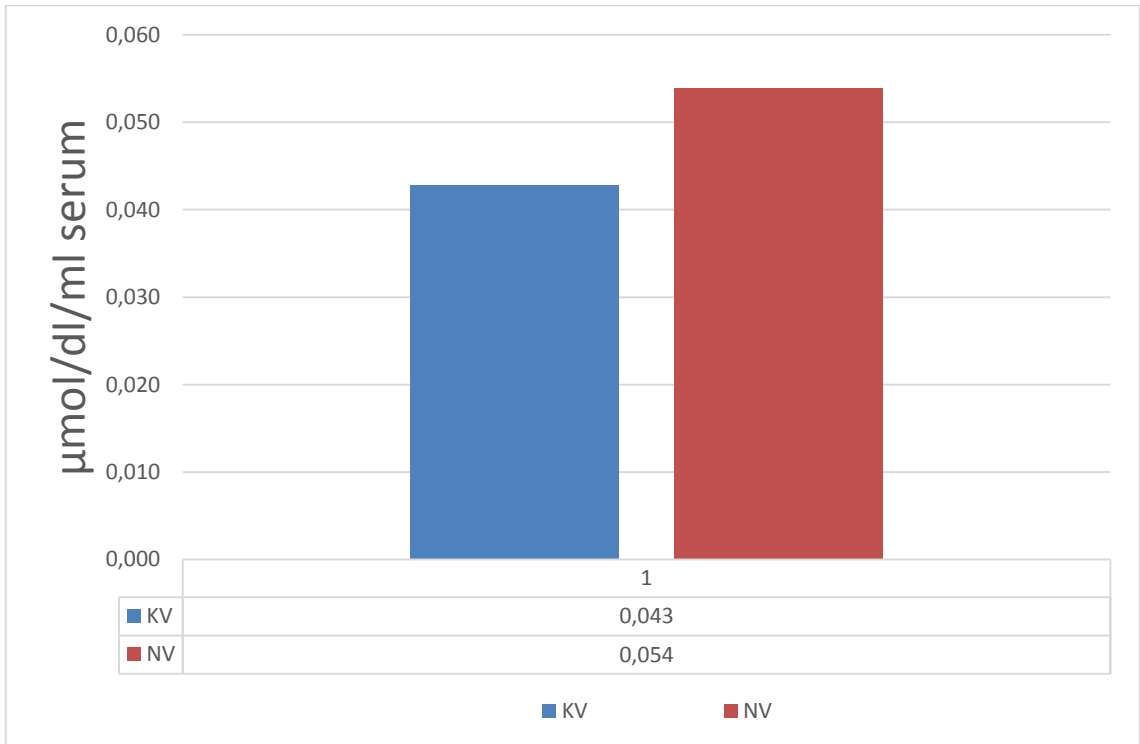
Genel olarak Nar Vadisi bireylerinin, Kaplumbağa vadisi bireyelerine göre yüksek bir GR enzim aktivitesi sergiledikleri Şekil 3.26. da gösterilmiştir.

Tablo 3.16.: Glutasyon redüktaz enzim aktivitesini etkileyen ay alan ve karapas uzunluk faktörleri

GR	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	1.0686	1.06855	13.7369	0.010013	*
Ay	5	4.6826	0.93652	12.0396	0.004397	*
Karapas Uzunluğu	1	0.8318	0.83179	10.6932	0.017033	*

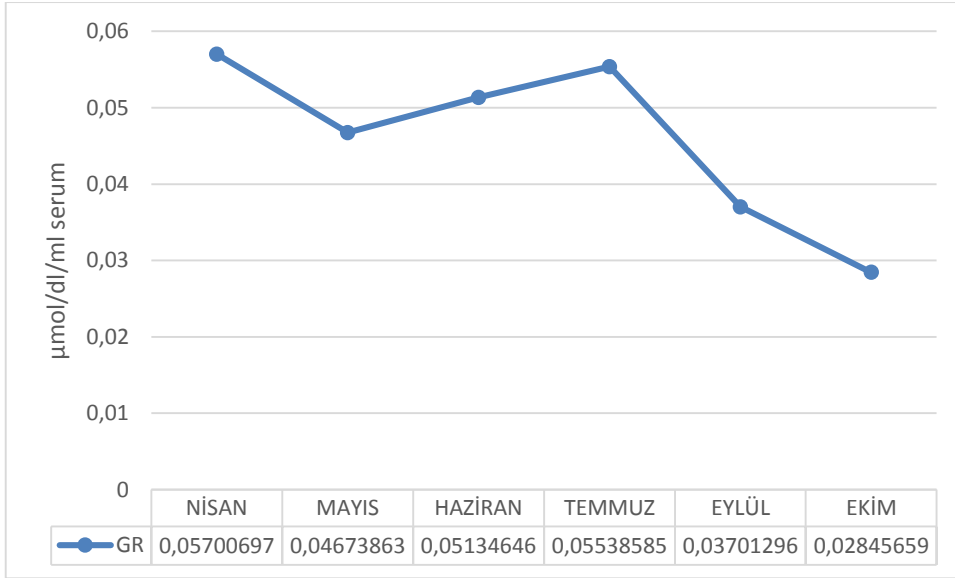
Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*:  $p < 0,05$



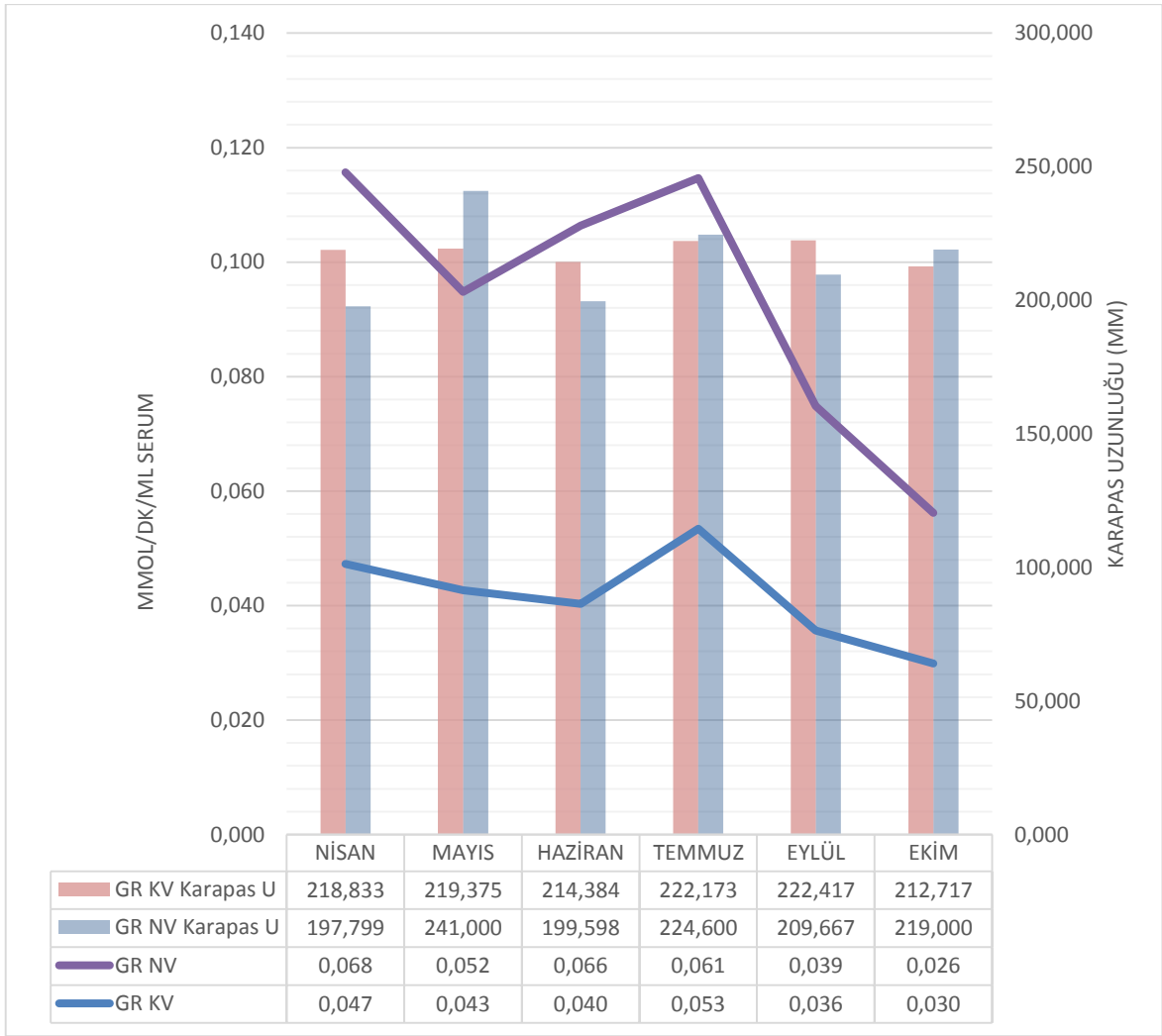
Şekil 3.26.: Alanlara göre genel glutasyon redüktaz enzim aktivitesi

Benzer şekilde “ay” faktörüne bağlı olarak da enzimin gösterdiği dalgalanma şekil 3.27 de sunulmuştur. Buna göre Nisan (0,057  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ) ve Temmuz ayları (0,055  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ) enzim yüksek bir aktivite gösterirken, Ekim ayında (0,028  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ) düşük bir aktivite ölçülmüştür (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27.: Aylara göre glutasyon reduktaz enzim aktivitesi

Yukarıdaki iki şekilde sözü edilen “alan” ve “ay” faktörleriyle GR aktivitesinin durumu ve bunu anlamlı ( $p < 0,05$ ) derecede etkileyen “Karapas Uzunluğu” Şekil 3.28.de sunulmuştur. Karapas uzunluklarının yüksek olduğu Temmuz ayı Nar vadisi için (0,061  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ) yüksek aktivitede saptanırken, Kaplumbağa vadisinde de benzer bir korelasyon olduğu görülmektedir (0,053  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ). Ekim ayına doğru da her iki alanda da GR enzim aktivitesinin düştüğü saptanmıştır (KV: 0,03  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ; NV: 0,026  $\mu\text{mol/dl/ml}$ ).



Şekil 3.28.: Alan X Ay ve karapas uzunluğu matrisinde glutatyon redükraz aktivitesi ilişkisi

### 3.2.1.3.3. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktivitesi sonuçları

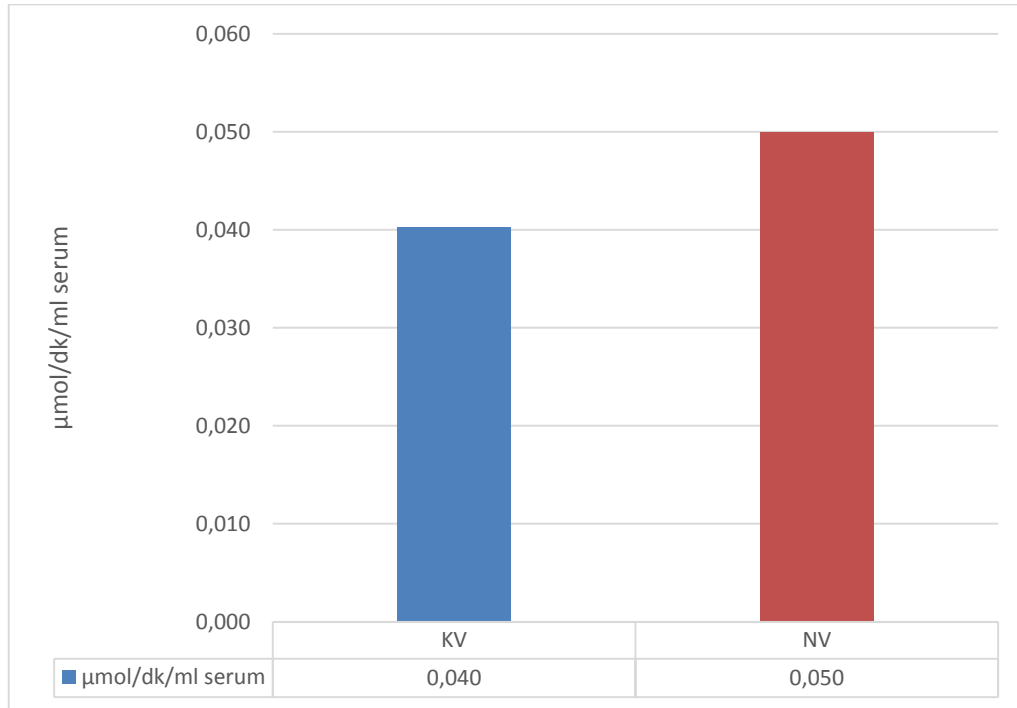
Glutatyon peroksidaz enzimi için ise sadece “Alan” faktörü istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0,05$ ) bulunmuştur (Tablo 3.17). Ölçülmüş olan enzim aktivitesi Nar vadisi bireylerinde ( $0,05 \mu\text{mol/dl/ml}$ ) Kaplumbağa vadisi bireylerinden ( $0,04 \mu\text{mol/dl/ml}$ ) daha yüksek bulunmuştur (Şekil 3.29.).

Tablo 3.17.: GPx enzim aktivitesini etkileyen alan faktörü

GST	Df	Toplam karesi	Ortalama karesi	F değeri	Pr(>F)	p
Alan	1	1.61373	1.61373	5.8142	0.04248	*

Df: serbestlik derecesi, F: F değeri, Pr(>F) (p): anlamlılık derecesi

\*:  $p < 0,05$



Şekil 3.29.: Nar vadisi ve Kaplumbağa vadisi bireylerinde ölçülen GPx aktivitesi

Bu çalışmada da serum oksidatif stres enzimleri olan GST, GR ve GPx ele alınmış ve bu enzimlerin aktivitelerinin değerlendirmelerinin neticesinde;

- 1) Organofosforlu insektisitler, kolinesteraz inhibisyonu ve kolinerjik etkilerin varlığının dışında, hayvanlarda bir yan etki olarak oksidatif stres ile sonuçlanabildiği bilinmektedir [79]. Yaptığımız çalışma da, buna benzer bir oksidatif stres durumunu ortaya koymuştur.
- 2) GST enzimi için, “ay” faktörü yüksek derecede önemli bir parametre olarak öne çıkmaktadır ( $p < 0,01$ ). *Bufo regularis* ile yapılmış olan, GST'nin sublethal etkilerinin değerlendirildiği çalışma ile de, artan pestisit

konsantrasyonunun bu enzimin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir [143]. Her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olan “alan x ay” faktörü ele alındığında da, Nar Vadisi’nde saptanan ve ( $p < 0,05$ ) düzeyinde önemli olan GST aktivitesindeki artış, Temmuz ayı başında kullanımı söz konusu olan chlorpyrifostan kaynaklı olabilir (Şekil 3.22.). Kaplumbağa Vadisi’nde ise mevsimsel dalgalanma seyrini önemli ölçüde etkileyecek ani bir artışın olmaması da bu görüşümüzü desteklemektedir. Zira GST besinlerle birlikte alınan toksik maddelerin eliminasyonunda rol oynayarak, reaktif elektrofilik bileşiklerin organizmaya zarar vermesini de önler [83].

- 3) GST enzim aktivitesi, kara kaplumbağalarında hibernasyona girerken ve çıkarken nispeten düşük seviyelerde saptanmıştır. Ancak Eylül ayından ( $0,058 \mu\text{mol/dk/ml}$  serum) Ekim ayına ( $0,068 \mu\text{mol/dk/ml}$  serum) doğru küçük de olsa bir artış söz konusudur. Belki bu artış canlının uzun inaktif periyoduna hazırlık amaçlı olabilir. Zira redoks homeostasisi sağlamak için canlılar enzim gibi bir takım endojen ve vitamin gibi egzogen antioksidant bileşikler kullandıkları bir koruma ve detoksifikasyon sistemi ile evrilmişlerdir [144;145].
- 4) Çevresel faktörlerin tetiklediği oksidatif stres koşullarında, GST gibi antioksidan enzimlerin ifadesini ve aktivitesini değerlendirirken alan, yaş, eşey, genetik yatkınlık, parazitlik, beslenme rejimi ve maruz kalma düzeyi, organizmanın koruyucu yanıtında önemli faktörlerdendir [76]. Meksika’daki iki bölgede çalışılan kertenkele (*Sceloporus* spp.) örneklerinden elde edilen sonuçlar, pestisit kullanımının yoğun olduğu yerlerde GST aktivitesindeki artışı göstermiştir [146]. Kertenkeleleri, sürüngen ekotoksikolojisi çalışmalarında model olarak değerlendiren bir çalışma, biyobelirteç olarak değerlendirilen vücut kondisyon indeksi, standart metabolik aktivite, lipid peroksidasyonu, parazitlilik gibi faktörlerin enzim aktivitesini etkileyebileceği öne sürülmüştür [147]. GST aktivitesi üzerine yapılan bu çalışmada ele aldığımız parametrelerden vücut büyüklüğü, eşey tipi ve kene varlığı gibi faktörler de kara kaplumbağalarının verdiği yanıtları etkileyici olmuştur. Bu etkilerden vücut büyüklüğü ve kene varlığı aylara göre de anlamlıdır. Örneğin hibernasyondan çıktıktan sonra çiftleşme için tükettikleri enerjiyi yerine koyarken beslenmesine bağlı olarak karapas uzunluğunu artırıp, bu

sayede kondisyon faktörünü dengeleyen kara kaplumbağalarındaki enzim aktivitesindeki dalgalanma ortaya çıkmış olabilir. Özellikle Temmuz ayında Nar Vadisindeki kaplumbağalarda kene varlığı (%80) , Kaplumbağa Vadisine (%46) göre neredeyse iki katında olması, canlının verdiği oksidatif stres yanıtının yüksek olmasına katkıda bulunmuş olabilir ( $p<0,05$ ) (Şekil 3.24.).

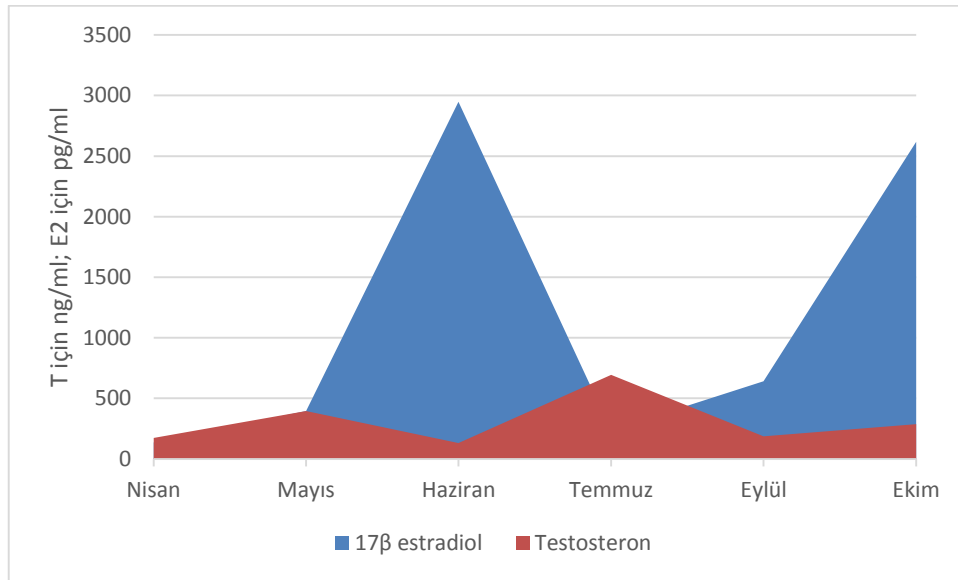
- 5) Genel olarak dişi bireyler, erkek bireylere kıyasla daha aktiftirler. Erkek bireylerin ise ancak çiftleşme dönemlerinde görece daha aktif olduğu görülür [1]. Dolayısıyla erkeklerin antioksidan mekanizmaları harekete geçirme hızı daha düşük olması da muhtemeldir. Bu nedenle erkeklerdeki (0,066  $\mu\text{mol/dk/ml}$  serum) total GST aktivitesi, dişilere göre daha düşük seviyede olabilir (0,104  $\mu\text{mol/dk/ml}$  serum) (Şekil 3.24.).
- 6) GST nin kimyasal kirliliği gözlemek için kara kaplumbağalarında da tıpkı balıklar ve yeşil deniz kaplumbağalarında önerildiği gibi yararlı bir biyobelirteç olabileceğini söyleyebiliriz [148;149].
- 7) GR enziminin aktivitesinin değerlendirilmesinde de “alan” ve “ay” faktörleri, GST gibi istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 3.16.). Salyangozlar (*Helix aspersa*) ile yapılan çalışmada salyangozların kısa dönemli estivasyon periyodunda bir değişiklik gözlenmezken, bizim çalışmamızda aylar arası dalgalanma çok daha belirgin ortaya çıkmıştır (Şekil 3.27.) [150]. Hibernasyondan çıkan kara kaplumbağaları oldukça yüksek bir GR aktivitesi üretirken, tarımsal aktivitenin yoğun olduğu Temmuz ayı dışında da aktivitesinin dalgalandığı söylenebilir. Mayıs ayında düşüşe etken olarak çiftleşme için enerji metabolizmasını o yöne yönlendirme öne çıkarken, Ağustos ayı yüksek estivasyon dönemini takip eden Eylül ve Ekim aylarında GR aktivitesinin azalmasında yıl içi ikinci çiftleşme dönem davranışları ve hibernasyona girişteki hipometabolizmaları etken olmuş olabilir [151]. Berglund ve ark. (2007), kuşlarda GR aktivitesindeki dalgalanmayı, çalıştığı ortamdaki kirleticilerden olan kurşun ve demire bağlamıştır [152]. Dolayısıyla oksidatif stresin bu enzim üzerine etkisi bu tip kirleticilere yanıt biçiminde olabilir. Ayrıca Blahova ve ark. (2013), zebra balıklarında (*Danio rerio*) GR aktivitesindeki artışın atrazine maruz kalma kaynaklı olabildiğini göstermiştir [153]. Nitekim yaptığımız çalışma ile

kullanılan organik fosforlu insektisitlerin kara kaplumbağalarında GR aktivitesinde artışa neden olmuş olabileceğini ifade edebiliriz.

GPx enziminde istatistiksel açıdan ( $p < 0,05$ ) sadece “alan” faktörüne bağlı bir fark olduğu saptanmıştır (Tablo 3.17.). GSH'ı GSSG'ye okside edip, hücrelerdeki peroksitleri indirgeyen GPx aktivitesi total olarak değerlendirildiğinde Nar vadisi bireylerinde ( $0,05 \mu\text{mol/dk/ml}$  serum), Kaplumbağa vadisi bireyelerine ( $0,04 \mu\text{mol/dk/ml}$  serum) göre yüksek çıkmış olması şaşırtıcı olmayacaktır (Şekil 3.29.) [80]. Ancak bu etkinin gerçekten de “alan” kaynaklı olduğunu belirtecek araştırma sayısı henüz yeterli düzeyde değildir. Sadece Blahova ve ark. (2013), zebra balıklarında (*Danio rerio*) GPx aktivitesindeki artışın, bir başka tip pestisit olan atrazine maruz kalmadan kaynaklı olabildiğini göstermiştir [153].

### 3.2.2. Plazma ile ölçümü yapılan eşey hormonları

Alan X ay bağlamında eşeysel olarak istatistiksel karşılaştırma yapabilecek kadar kara kaplumbağası örneklemini alamadığından, her iki çalışma alanındaki bireyler bir arada değerlendirilmiştir. Nisan-Ekim 2012 tarihleri arasında kara kaplumbağalarının gösterdiği mevsimsel dalgalanma Şekil 3.30 da gösterilmiştir.



Şekil 3.30.: Aylara göre eşey hormonları düzeyi



Buna göre testosteron hormonu Mayıs ve Temmuz ayında artış gösterirken; estradiolün ise Haziran ve Ekim aylarında seviyesi yükselmiştir. Diğer yandan testosteron Haziran ve Ekim aylarına doğru azalmışken, estradiolün seviyesi yaz ortası dönem olan Temmuz ayında düşüş göstermiştir.

Ott ve ark. (1999), bulgularımıza benzer biçimde Gopher kaplumbağalarında (*Gopherus polyphemus*) Temmuz döneminde testosteronun artışının spermatogenez ile ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir [154]. Mahmoud ve Licht (1997) ise testosterondaki Haziran ayındaki düşüşün Temmuz ayına kıyasla baskılanan testis konformasyonu ile ilgili olduğunu ifade etmişlerdir [155]. Bu düşüş çalışma alanlarından elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. Kara kaplumbağalarında sonbahar döneminde gözlenen spermatogenez ile üretilen spermler, sonraki yıl aktif döneminde kullanıldıklarından Temmuz dönemindeki artışın devamında gözlenen Eylül ayı düşük seviyesi ile Ekim ayında gözlenen nispi artış bu durumu açıklayabilir [1;36]. Bununla beraber plazma testosteronundaki artış erkek kara kaplumbağalarının teritorya korunumu, agresiflik gibi genel aktivite davranışıyla da ilişkilidir [156]. Çalışma yaptığımız alanlardaki orta yaz dönemi testosteron seviyesi artışını açıklamada bu davranışların rolünün de olduğunu söyleyebiliriz.

Karasal bir tür olan Gopher kaplumbağalarında, Eylül ve Ekim aylarında gözlenen estradiol artışının geç yaz sonrası dönem ile korele olan yumurtalık genişlemesi ve vitellogenesis ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir [154]. Ancak bazı deniz kaplumbağalarında çalışmamıza zıt biçimde estradiol seviyesi dalgalanması yıllık aktivitelerinde, kaplumbağaların tek ya da çok kuluçka dönem(ler)i ile ilişkili olabilir [157]. Kara kaplumbağalarının üreme fenolojisine bakıldığında Haziran ayına doğru artan estradiol seviyesinin yumurtlama ve kuluçka oluşturma ile Temmuz ayı düşüşüyle de yumurtlama sonlanıp, yumurta inkübasyonu ile paralel olduğu görülür [39]. Bu bakımdan elde ettiğimiz sonuçlar anlamlı ve canlının biyolojisi ile uyumludur.

Hem testosteron hem de estradiol için kara kaplumbağalarının aktif dönemlerindeki meteorolojik koşullar (ortalama sıcaklık, nem, yağış, güneşlenme değerleri) değerlendirildiğinde Ağustos ayında seyreden görece yüksek sıcaklık değerlerinin canlıyı yüksek estivasyona yönlendirmesi dışında bu değerler mevsim normallerinde seyretmiştir. Eşey hormonlarının poiklotermik canlılarda

çevresel değişimlerden etkilendiği bilinmektedir [158]. Ancak sağlıklı değerlendirmeler yapabilmek için hem hormon düzeyi hem de çevresel parametrelere ait uzun soluklu veri setlerine ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, tarımsal alan olan Nar Vadisi ve nispeten herhangi bir kirliliğin söz konusu olmadığı Kaplumbağa Vadisi'nde yaşıyan kara kaplumbağalarında, pestisite maruz kalma ile birlikte BChE,CbE,GST,GPx ve GR enzim aktivitelerinde artış gözlenmiştir. Bu enzimlerden örneğin CbE'ye göz atıldığında, enzimin 1-NA substratı ile etkileşiminin alandaki pestisit etkisini yansıtmada başarılı olduğu söylenebilir. Benzer şekilde BChE enzimi de doğadaki pestisitle karşı karşıya kalma durumlarında gösterdiği etkinlikle başarılı bir biyobelirteç olarak düşünülebilir.

Oksidatif stres enzimlerinin ise tek başlarına birer metabolik profil ifade etmesi yeterince uygun olmadığından, hep beraber değerlendirildiklerinde canlıda organik fosfat kirliliğine verilen yanıtları anlamlı kılan veriler sunmuştur.

Ancak yaşamları uzun olan kara kaplumbağalarında daha başarılı ve anlamlı bilgilere ulaşmak için daha uzun dönemli veriler toplanıp, buna göre değerlendirme yapmak fayda sağlayacaktır. Yaptığımız bu çalışma, bu anlamda bir başlangıç araştırmaları olarak değerlendirilmelidir.

## KAYNAKLAR

- [1] Arslan, G. Kapadokya Bölgesi'nde (Nevşehir) kara kaplumbağası (*Testudo graeca* Linnaeus, 1758) üzerine biyo-ekolojik çalışmalar (doktora tezi), **2013**.
- [2] Fritz, U., Hundsdoerfer, A.K., Široký, P., Auer, M., Kami, H., Lehmann, J., Mazanaeva, L.F., Türkozan, O., Wink, M., Phenotypic plasticity leads to incongruence between morphology-based taxonomy and genetic differentiation in western Palearctic tortoises (*Testudo graeca* complex; Testudines, Testudinidae), *Amphibia-Reptilia*, 28, 97-121, **2007**.
- [3] Budak, A. ve Göçmen, B., Herpetology, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No. 194, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-Izmir, 226 pp. [2nd Edition], **2008**.
- [4] Çiçek, K. ve Ayaz, D., *Aestivation observed in Testudo graeca ibera* PALLAS, 1814 in Southern Anatolia (Turkey), *Herpetozoa*, 23(3/4), 84-86, **2011**.
- [5] Chávarri, M., Eduardo, B., Andrés, G., Eva, G., Carlos, M.C., Juana, M., Ortiz, R.R.Y., Differences in helminth infections between captive and wild spur-thighed tortoises *Testudo graeca* in southern Spain: A potential risk of reintroductions of this species, *Veterinary Parasitology*, 187, 491-497, **2012**.
- [6] El Mouden, E.H., Slimani, T., Kaddour, B.K., Lagarde, F., Ouhammou, A., Bonnet, X., *Testudo graeca graeca* feeding ecology in an arid and overgrazed zone in Morocco, *Journal of Arid Environments*, 64, 422-435, **2006**.
- [7] Lapid, R., Nir, I., Snapir, N., Robinzon B., Reproductive traits in the spur-thighed tortoise (*Testudo graeca terrestris*): new tools for the enhancement of reproductive success and survivorship, *Theriogenology*, 61(6), 1147-1162, **2004**.
- [8] Kaddour, B.K., Slimani, T., El Mouden, E.H., Lagarde, F., Bonnet, X., Population structure, population density and individual catchability of *Testudo graeca* in the Central Jbilets (Morocco), *Vie et Milieu*, 56, 49-54, **2006**.

- [9] <http://www.iucnredlist.org/details/21646/0> , Erişim tarihi: 21/12/2013.
- [10] evik, E., Trakya kara kaplumbağalarının (*Testudo graeca* ve *Testudo hermanni*) taksonomik durumları. 8. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-5 Eylül, İzmir, Türkiye, **1987**.
- [11] Tok, V., The taxonomy and ecology of *Mauremys caspica rivulata* Valenciennes. 1833 (Testudinata: Bataguridae) and *Testudo graeca iberica* Pallas, 1811 (Testudinata: Testudinidae) on Reşadiye (Data) Peninsula. *Turkish Journal of Zoology*, 23, 17-21, **1999**.
- [12] Taşkavak, E., Türkozan, O., Kumlutaş, Y., Some investigations on the taxonomic status of *Testudo graeca* from the Aegean and Mediterranean Regions of Turkey, International Congress on Testudo Genus Gonfaron, March 7-10, Hyres, France, **2001**.
- [13] Turkozan, O., Kumlutaş, Y., Arıkan, H., Ilgaz ., Avcı, A., Morphological and serological comparison of Mediterranean spur- thighed tortoises, *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 from the Aegean region and southeastern Turkey, *Zoology in the Middle East*, 29, 41-50, **2003**.
- [14] Turkozan, O., Ayaz, D., Tok, C.V., Cihan, D., On *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 specimens of Mardin Province, *Turkish Journal of Zoology*, 27, 145-151, **2003**.
- [15] Turkozan, O., Kiremit, F., Parham, J. F., Olgun, K., Taskavak, E.. A quantitative reassessment of morphology-based taxonomic schemes for Turkish tortoises (*Testudo graeca*), *Amphibia-Reptilia*, 3, 69-83, **2010**.
- [16] Van Abbema, J., Conservation, restoration, and managment of tortoises and turtles. Proceed international conference, New York turtle & tortoise society, New-York, U.S.A., **1997**.
- [17] Kaddour, B.K., Slimani, T., El Mouden, E.H., Lagarde, F., Bonnet, X., Population structure, population density and individual catchability of *Testudo graeca* in the Central Jbilets (Morocco), *Vie et Milieu*, 56, 49-54, **2006**.
- [18] Vitt, L. J. ve Caldwell, J.P., Herpetology, 3rd Edition, **2009**.
- [19] Baillie, J., Groombridge, B., IUCN Red List of Threatened Animals, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, **1996**.

- [20] Diaz-Paniagua, C., Keller, C., Andreu, A.C., Long-term demographic fluctuations of the spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*, in SW Spain, *Ecography*, 24, 707-721, **2001**.
- [21] Mason, M. C. et al.. Leopard tortoises (*Geochelone pardalis*) in Valley Bushveld, Eastern Cape, South Africa: specialist or generalist herbivores? *Chelonian Biology of Conservation*, 3, 435–440, **1999**.
- [22] Bayley, R.J., Highfield, A.C., Observations on ecological changes threatening a population of *Testudo graeca graeca* in the Souss Valley, southern Morocco, *Chelonian Conservation and Biology*, 2, 36-42, **1996**.
- [23] Iftime A., Iftime O., Long term observations on the alimentation of wild Eastern Greek Tortoises *Testudo graeca iberica* (Reptilia: Testudines: Testudinidae) in Dobrogea, Romania, *Acta Herpetologica*, 7(1), 105-110, **2012**.
- [24] Moskovits, D.K., Bjorndal, K.A., Diet and food preferences of the tortoises *Geochelone carbonaria* and *G. denticilata* in northwestern Brazil, *Herpetologica* 46, 207-218, **1990**.
- [25] Milton, S.J., Plant eaten and dispersed by adult leopard tortoises *Geochelone pardalis* (Reptilia: Chelonii) in the southern Karoo, *South African Journal of Zoology*, 27, 45-49, **1992**.
- [26] Rall, M., Fairall, N., Diets and food preferences of two South African tortoises *Geochelone pardalis* and *Psammobates oculifer*, *South African Journal of Wildlife Research*, 23, 63-70, **1993**.
- [27] Keirans, J.E., Systematic of the Ixodida (*Argasidae*, *Ixodidae*, *Nutalliellidae*): an overview and some problems. *Tick Vector Biology Medical and Veterinary Aspects* (eds: B Fivaz, T Petney, I Horak), Springer-Verlag, Berlin; 1-21, **1985**.
- [28] Traversa, D., Capelli, G., Iorio, R., Bouamer, S., Cameli, A., Giangaspero, A., Epidemiology and biology of nematodofauna affecting *Testudo hermanni*, *Testudo graeca* and *Testudo marginata* in Italy, *Parasitology Research*, 98(1), 14-20, **2005**.
- [29] Baker, M. R., Synopsis of the nematode parasitic in amphibian and reptiles, Memorial University of Newfoundland, **1987**.

- [30] Horak, I.G., Camicas, J.L., Keirans, J.E., The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A World List of Valid Tick Names, *Experimental & Applied Acarology*, Volume 28, 1-4, pp 27-54, **2002**.
- [31] Siroky, P., Jandzik D., Mikulicek P., Moravec J., Országh I., *Leptoconops bezzii* (Diptera: Ceratopogonidae) parasitizing tortoises *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) in mountain ranges of Lebanon and western Syria, *Parasitology Research*, 101, 485-489, **2007**.
- [32] Mazzotti, S., Pisapia, A., Fasola, M., Activity and home range of *Testudo hermanni* in Northern Italy, *Amphibia-Reptilia*, 23, 305-312, **2002**.
- [33] Gibbons, J.W., Movement patterns among turtle populations: Applicability to management of the desert tortoise, *Herpetologica*, 42, 104-113, **1986**.
- [34] Roques, S., Diaz-Paniagua, C., Andreu A.C. Microsatellite markers reveal multiple paternity and sperm storage in the Mediterranean spur-thighed tortoise, *Testudo graeca*, *Canadian Journal of Zoology*, 82, 153–159, **2004**.
- [35] Crews, D., Moore, M.C.,. Historical contributions of research on reptiles to beahvioral neuroendocrinology, *Hormones and Behavior*, 48, 384-394, **2005**.
- [36] Ibargüengoytia, N.R., Pastor, L.M., Pallares, J., A light microscopy and ultrastructural study of the testes of tortoise *Testudo graeca* (Testudinidae), *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 31, 221-230, **1997**.
- [37] Lapid, R., Nir, I., Snapir, N., Robinzon B., Reproductive traits in the spur-thighed tortoise (*Testudo graeca terrestris*): new tools for the enhancement of reproductive success and survivorship, *Theriogenology*, 61(6), 1147-1162, **2004**.
- [38] Kuchling, G., The Reproductive biology of the Chelonia, Berlin, Germany, Springer, **1999**.
- [39] Diaz-Paniagua, C., Keller, C., Andreu A.C., Clutch frequency, egg and clutch characteristics, and nesting activity of spur-tighed tortoises, *Testudo graeca*, in South- western Spain, *Canadian Journal of Zoology*, 74, 560-564, **1996**.

- [40] Turgut, C., editör, *Ekotoksikolojinin Temel İlkeleri*, 3. Baskıdan çeviri, Palmiye yayıncılık, **2013**.
- [41] Gibbons, J.W., Scott D.E., Ryan T.J., Buhlmann K.A., Tuberville T.D., Metts B.S., Greene J.L., Mills T.M., Leiden Y., Poppy S., Winne C.T., Reptiles in Decline: The Global Decline of Reptiles, Déjà vu Amphibians. *BioScience* 50(8):653—666, **2000**.
- [42] Hopkins, W.A., Reptile toxicology: challenges and opportunities on the last frontier in vertebrate ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2391-2393, **2000**.
- [43] Shelby, J.A., Mendonca, M.T., Comparison of reproductive parameters in male yellow-blotched map turtles (*Graptemys flavimaculata*) from a historically contaminated site and a reference site. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology* 129:233–242, **2001**.
- [44] Bergeron, C.M., Husak, J.F., Unrine, J.M., Romanek, C.S., Hopkins, W.A., Influence of feeding ecology on blood mercury concentrations in four species of turtles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26:1733–1741, **2007**.
- [45] Campbell, K.R., Campbell, T.S., The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 253–301, **2001**.
- [46] Campbell, K.R., Campbell, T.S., Lizard contaminant data for ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 165, 39–116, **2000**.
- [47] Romero, L.M., Wikelski, W., Severe effects of low-level oil contamination on wildlife predicted by the corticosterone-stress response: preliminary data and a research agenda. *Spill Science & Technology Bulletin* 7:309–313, **2002**.
- [48] Sánchez-Hernández, J.C., Carbonell, R., Pérez, H.A., Montealegre M., Gómez L., Inhibition of plasma butyrylcholinesterase activity in the lizard *Gallotia galloti palmae* by pesticides: a field study, *Environmental Pollution* 132 (3), 479-488, **2004**.

- [49] Hopkins, W.A., Winne, C.T., DuRant, S.E., Differential swimming performance of two natricine snakes exposed to a cholinesterase-inhibiting pesticide. *Environmental Pollution* 133:531–540, **2005**.
- [50] Holem, R.R., Hopkins, W.A., Talent, L.G., Effect of acute exposure to malathion and lead on sprint performance of the western fence lizard (*Sceloporus occidentalis*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51:111–116, **2006**.
- [51] Hopkins, W.A., Winne, C.T., Influence of body size on swimming performance of four species of neonatal natricine snakes acutely exposed to a cholinesterase-inhibiting pesticide. *Environmental Contamination and Toxicology*, 25:1208–1213, **2006**.
- [52] DuRant, S.E., Hopkins, W.A., Talent, L.G., Energy acquisition and allocation in an ectothermic predator exposed to a common environmental stressor. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145:442–448, **2007**.
- [53] Martínez-López, E., Sousa, A. R., María-Mojica, P., Gómez-Ramírez, P., Guilhermino, L., García-Fernández, A. J., Blood  $\delta$ -ALAD, lead and cadmium concentrations in spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) from Southeastern Spain and Northern Africa, *Ecotoxicology*, Volume 19, Issue 4, pp 670-677, **2010**.
- [54] Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R., Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators for contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*, 102:680–688, **1994**.
- [55] Semenza, J.C., Tolbert, P.E., Rubin, C.H., Guillette, Jr L.J., Jackson, R.J., Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, FL. *Environmental Health Perspectives* 105:1030–1032, **1997**.
- [56] Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Congdon, J.D., Elevated trace element concentrations and standard metabolic rate in banded water snakes (*Nerodia fasciata*) exposed to coal combustion wastes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18:1258–1263, **1999**.
- [57] Sparling, D.V., Linder, G., Bishop, C.A., Krest S.K., *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Second Edition, CRC Press, **2010**.



- [58] Jagoe, C.H., Arnold-Hill, B., Yamochko, G.M., Winger, P.V., Brisbin, Jr I.L., Mercury in alligators (*Alligator mississippiensis*) in the southeastern United States. *Science of the Total Environment*, 213:255–262, **1998**.
- [59] Guillette, Jr L.J., Brock, J.W., Rooney, A.A., Woodward, A.R., Serum concentrations of various environmental contaminants and their relationship to sex steroid concentrations and phallus size in juvenile American alligators. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36:447–455, **1999**.
- [60] Guillette, L.J., Crain, D.A., Gunderson, M.P., Kools, S.A.E., Milnes, M.R., Orlando, E.F., Rooney, A.A., Woodward, A.R., Alligators and endocrine disrupting contaminants: a current perspective. *American Zoologist*, 40:438–452, **2000**.
- [61] Campbell, K.R., Campbell, T.S., A logical starting point for developing priorities for lizard and snake ecotoxicology: a review of available data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21:894–898, **2002**.
- [62] National Pesticide Information Center, <http://npic.orst.edu/npicfact.htm> Erişim tarihi 07.11.2013 .
- [63] Demirdögen, B.C., Organofosfatlı-pestisit-zehirlenmeleri ve Serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (2): 97-112, **2010**.
- [64] Costa, L.G., Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta*, 366:1-13. **2006**.
- [65] [www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/chlorpyrifos\\_ired.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/chlorpyrifos_ired.pdf) Erişim tarihi 07.11.2013.
- [66] Kidd, H., James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (as updated).5-14, **1991**.
- [67] <http://www.toxipedia.org/display/toxipedia/Carbaryl> Erişim tarihi 08.11.2013.
- [68] <http://www.epa.gov/ttnatw01/hlthef/carbaryl.html> Erişim tarihi 08.11.2013.

- [69] Sanchez-Hernandez, J.C., Ecotoxicological perspectives of B-esterases in the assesment of pesticide contamination, *Environmental Pollution: New research*, 1-45, **2007** .
- [70] Aldridge, W.N., Two types of esterases (A and B) hydrolysing nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination, *Biochemical Journal.*, 53, 110-117, **1953**.
- [71] Parsons K.C., Schmidt, S.R., Tarbill, G., Tucker K.R., Sublethal Effects of Exposure to Cholinesterase-inhibiting Pesticides: Humans and Vertebrate Wildlife, Final Report, Manomet Center for Conservation Sciences, **2005**.
- [72] Fukuto, T.R., Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides, *Environmental Health Perspectives*, 87,245-254, **1990**.
- [73] Sogorb, M.A., Vilanova, E., Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis, *Toxicology Letters*, 128:215–228, **2002**.
- [74] Wheelock, C.W., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D., Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and Toxicity Identification Evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 195, 117–178, **2008**.
- [75] Imai, T., Human carboxylesterase isozymes: catalytic properties and rational drug design. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21:173–185, **2006**.
- [76] Limon-Pacheco, J., M.E. Gonsebatt, M.E., The role of antioxidants and antioxidantrelated enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress, *Mutation Research*, 674,137–147, **2009**.
- [77] Sigolaeva, L., Makhaeva, G., Rudakova, E., Boltneva, N., Porus, M., Dubacheva, G., Eremenko, A., Kurochkin, I., Richardson, R. J., Biosensor analysis of blood esterases for organophosphorus compounds exposure assessment: approaches to simultaneous determination of several esterases, *Chemico-Biological Interactions*, 187(1–3), 312–317, **2010**.
- [78] Halliwell, B., Gutteridge, J., (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, pp. 105–245, **1999**.

- [79] Lukaszewicz-Hussain, A., Role of oxidative stress in organophosphate insecticides toxicity – short review, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 98 145–150, **2010**.
- [80] Koivula, M.J. & Eeva, T., Metal-related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution*, 158, 2359–2370, **2010**.
- [81] Mateos, R., Bravo L., Chromatographic and electrophoretic methods for analysis biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, proteins). *Journal of Separation Science*, 30, 175 – 191, **2007**.
- [82] Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammal members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemistry Journal*, 360 (Pt 1): 1 – 16, **2001**.
- [83] Ari, F., Dere, E., Benzenin Karacığer Glutatyon S-transferaz Enzim Aktivitesi Üzerine *In vitro* Etkisi, *C.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, Cilt:24 Sayı:1, **2003**.
- [84] Laborde, E., "Glutathione transferases as mediators of signaling pathways involved in cell proliferation and cell death". *Cell Death & Differentiation*, 17 (9): 1373–80, **2010**.
- [85] Beckett, G.J., Chapman, B.J., Dyson, E.H., Hayes, J.D., "Plasma glutathione S-transferase measurements after paracetamol overdose: evidence for early hepatocellular damage". *Gut*, 26 (1): 26–31, **1985**.
- [86] Loguercio, C., Caporaso, N., Tuccillo, C., Morisco, F., Del Vecchio Blanco, G., Del Vecchio Blanco, C. "Alpha-glutathione transferases in HCV-related chronic hepatitis: a new predictive index of response to interferon therapy?". *Journal of Hepatology*. 28 (3): 390–5, **1998**.
- [87] Mills, G., "Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown". *The Journal of Biological Chemistry*, 229 (1): 89–97, **1957**.
- [88] Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., Van Remmen, H., "Trends in oxidative aging theories". *Free Radical Biology & Medicine*. 43 (4): 477–503, **2007**.

- [89] Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Müller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R., Becker, K. , "Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*". *Science*, 291 (5504): 643–6, **2001**.
- [90] Champe, D., Biochemistry, Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. **2008**.
- [91] Swaab, D.F., Garcia-Falgueras, A. , "Sexual differentiation of the human brain in relation to gender identity and sexual orientation". *Functional Neurology*, 24 (1): 17–28, **2009**.
- [92] [www.peaktestosterone.com/Testosterone\\_Pesticides.aspx](http://www.peaktestosterone.com/Testosterone_Pesticides.aspx) Erişim Tarihi: 16.11.2013.
- [93] Behl, C., Widmann, M., Trapp, T., Holsboer, F., "17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216 (2): 473–82, **1995**.
- [94] [http://www.worldmapfinder.com/Google\\_Earth.php?ID=/En/Europe/Turkey/Nevsehir\\_Province](http://www.worldmapfinder.com/Google_Earth.php?ID=/En/Europe/Turkey/Nevsehir_Province) Erişim Tarihi: 22.12.2013.
- [95] Pough, F.H., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitzky, A.H., Wells, K. D., Herpetology, Prentice Hall, U.S.A., **2001**.
- [96] Bagenal, T.B., Tesch, F.W., Methods for assessment of a fish production in fresh waters. In: Bagenal, T.B. (Ed.), *Age and Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., pp.101–136, **1978**.
- [97] Lagarde, F., Bonnet, X., Henen, B.T., Corbin, J., Nagy, K.A., Naulleau, G., A short spring before a long jump: the ecological challenge to the steppe tortoise (*Testudo horsfieldi*), *Canadian Journal of Zoology*, 80, 493-502, **2002**.
- [98] Lagarde, F., Bonnet, X., Henen, B.T., Corbin, J., Nagy, K.A., Mardonov, B., Naulleau, G., Foraging behaviour and diet of an ectothermic herbivore: *Testudo horsfieldi*, *Ecography*, 26, 236-242, **2003**.
- [99] Gordon, I.J., Animal-based techniques for grazing ecology research. *Small Ruminant Research*, 16, 203-214, **1995**.

- [100] McArthur S., Wilkinson R., Meyer J., "Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles, Blackwell Publishing, **2004**.
- [101] Ellman, L., Courtney, K.D., Andreas Jr., V., Featherstone, R.M., A new rapid colorimetric determination of cholinesterase activity, *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88–95. **1961**.
- [102] Sanchez-Hernandez, J.C., Moreno Sanchez, B., Lizard cholinesterases as biomarkers of pesticide exposure: enzymological characterization. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2319–2325, **2002**.
- [103] Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *Journal of Biological Chemistry*, 249, pp. 7130–7139, **1974**.
- [104] Lawrence, R.A., Burk, R.F., Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochemical and Biophysics Research Community*, 71, 952 – 958, **1976**.
- [105] Carlberg, I., Mannervik B., Glutathione reductase levels in rat brain, *Journal of Biological Chemistry*, 250, pp. 5475–5480, **1975**.
- [106] Diaz-Paniagua, C., Keller C., Andreu A.C., Annual activity patterns of the spur-tighed tortoise, *Testudo graeca*, in the Dofiana National Park, SW Spain. *Herpetologica*, 51, 225-233, **1995**.
- [107] Anadón, J.D., Jiménez, A., Martínez, M., Martínez, J., Pérez, I., Esteve, M.A., Factors determining the distribution of the spur-thighed tortoise *Testudo graeca* in south-east Spain: a hierarchical approach, *Ecography*, 29, pp. 339–346, **2006**.
- [108] Franz, R., Hummel, J., Müller, D.W.H., Bauert, M., Hatt, J.-M., Clauss M., Herbivorous reptiles and body mass: effects on food intake, digesta retention, digestibility and gut capacity, and a comparison with mammals, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158, pp. 94–101, **2011**.
- [109] Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-249, **2003**.
- [110] Siroky, P., Kamler, M., Modry, D., Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of

tortoises of the genus *Testudo* in the east Mediterranean region., *Folia Parasitologica* 52: 359–361, **2005**.

- [111] Mihalca, A.D., Racka, K., Gherman, C., Lonescu, D.T., Prevalence and intensity of blood apicomplexan infections in reptiles from Romania. *Parasitology Research*, 102: 1081–1083, **2008**.
- [112] Haitlinger, R., Acari (Arachnida) and Anoplura (Insecta) collected on small mammals, reptiles and insects in Greece and Cyprus. *Biologia Gallo-hellenica*, 20, 83-88, **1993**.
- [113] Zlatanova, O., Iksodovi karlezhi (Parasitiformes, Ixodidae) na suhozemnite kostenurki (Reptilia, Testudinidae) v Balgaria (Ixodid ticks (Parasitiformes, Ixodidae) of tortoises (Reptilia, Testudinidae) in Bulgaria). *Acta Zoologica Bulgarica*, 41, 77–79, **1991**.
- [114] Hoogstraal, H., Wassef, H.Y., Buttiker, W. Ticks (Acarina) of Saudi Arabia, fam. Argasidae, Ixodidae, Fauna of Saudi Arabia, 3, 25–110, **1981**.
- [115] Siroky, P., Petrzalkova K.J., Kamler, M., Mihalca Andrei, D., Modry, D. *Hyalomma aegyptium* as dominant tick in tortoises of the genus *Testudo* in Balkan countries, with notes on its host preferences. *Experimental and Applied Acarology*, 40, 279-290. **2006**.
- [116] Sonenshine, D.E., Biology of ticks, Oxford University Press, New York, Oxford, 41(2), 77-79, **1993**.
- [117] Willemsen R.E., Hailey A., Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises , *Journal of Zoology* (London), 260, 353-365, **2003**.
- [118] Grosbois, V., Henry, P.Y., Blondel, J., Perret, P., Lebreton, J.D., Thomas, D.W., Lambrechts, M.M., Climate impacts on Mediterranean blue tit survival: an investigation across seasons and spatial scales, *Global Change Biology*, 12, 2235-2249, **2006**.
- [119] McCarty, J., Ecological consequences of recent climate change, *Conservation Biology*, 15, 320-331, **2001**.
- [120] Fernandez-Chacon A., Bertolero, A., Amengual, A. Tavecchia G., Homar V., Oro D., Spatial heterogeneity in the effects of climate change on the

population dynamics of a Mediterranean tortoise, *Global Change Biology*, 17, 3075-3088, **2011**.

- [121] Sanchez-Hernandez, J.C., Wildlife Exposure to Organophosphorus Insecticides, *Environmental Contamination and Toxicology*, 172:21-63, **2001**.
- [122] Doctor, B.P., Saxena, A., Bioscavengers for the protection of humans against organophosphate toxicity., *Chemico-Biological Interactions*, 157-158,167-171, **2005**.
- [123] Maxwell, D.M., Brecht, K.M., Carboxylesterases: specificity and spontaneous, reactivation of an endogenous scavenger for organophosphorus compounds, *Journal of Applied Toxicology*, 21, 103-107, **2001**.
- [124] Amaral, M.J., Sanchez-Hernandez, J.C., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Valente, R., Faustino, A.M.R., Soares, A.M.V.M. & Mann, R.M.. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei* Seoane) exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 2345-2353, **2012**.
- [125] Sanchez-Hernandez J.C., Evaluating reptile exposure to cholinesteraseinhibiting agrochemicals by serum butyrylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22: 296–301, **2003**.
- [126] Bassó, A., Attademo, A. M., Lajmanovich, R., Peltzer, P. M., Junges, C., Cabagna, M. C., Plasma esterases in the tegu lizard *Tupinambis merianae* (Reptilia, Teiidae): impact of developmental stage, sex and organophosphorus *in vitro* exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 19, 214–225, **2012**.
- [127] Sanchez, J.C., Fossi, M.C., Focardi, S., Serum B esterases as a nondestructive biomarker in the lizard *Gallotia galloti* experimentally treated with parathion, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16:1954–1961, **1997**.
- [128] Meyer, E., Sparling, D., Blumenshine, S., Regional inhibition of cholinesterase in free-ranging western pond turtles (*Emys marmorata*) occupying California mountain streams, *Environmental Toxicology and Chemistry*., 32(3):692-8, **2013**.

- [129] Chuiko, G.M., 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, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 127 (3), 233-242, **2000**.
- [130] Phillips, T.A., Summerfelt, R.C., Atchison, G.J., Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in walleye (*Stizostedion vitreum*), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(1), 75-80, **2002**.
- [131] Sanchez-Hernandez, J.C., Mazzia, C., Capowicz, Y., Rault, M., Carboxylesterase activity in the earthworm gut content: potential (eco)toxicological implications., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150, 503–511, **2009**.
- [132] Wadkins, R.M., Hyatt, J.L., Edwards, C.C., Tsurkan, L., Redinbo, M.R., Wheelock, C.E., Jones, P.D., Hammock, B.D., Potter, P.M., Analysis of mammalian carboxylesterase inhibition by trifluoromethylketone-containing compounds. *Molecular Pharmacology*, 71, 713–723, **2007**.
- [133] Wogram, J., Sturm, A., Segner, H., Liess, M., Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (7), 1528-31, **2001**.
- [134] Estevez, J., Vilanova, E., Model equations for the kinetics of covalent irreversible enzyme inhibition and spontaneous reactivation: esterases and organophosphorus compounds, *Crit Rev Toxicol*, 39(5):427-48, **2009**.
- [135] Cobos, V.M., Mora, M.A., Escalona, G., Calme, S., Jiménez, J., Variation in plasma cholinesterase activity in the clay-colored robin (*Turdus grayi*) in relation to time of day, season, and diazinon exposure, *Ecotoxicology*, 19(2):267-72, **2010**.
- [136] Geering K., Freyvogel T.A., The distribution of acetylcholine and unspecific esterases in the midgut of female *Aedes aegypti* L., *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 49:775–784, **1974**.
- [137] Mommsen, T.P., Digestive enzymes of a spider (*Tegenaria atrica* Koch)—III. Esterases, phosphatases, nucleases. *Comparative*



Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology, 60:377–382, **1978**.

- [138] Wassmer, B., Augenstein, U., Ronai, A., De Looze, S., Von Deimling, O., Lymph esterases of the house mouse (*Mus musculus*)—II. The role of esterase-2 in fat resorption. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 91:179–185, **1988**.
- [139] Van Lith, H.A., Van Zutphen, L.F., Beynen A.C., Butyrylcholinesterase activity in plasma of rats and rabbits fed high-fat diets, *Comparative Biochemistry and Physiology* 98:339–342, **1991**.
- [140] Dolinsky, V.W., Gilham, D., Alam, M., Vance, D.E., Lehner, R., Triacylglycerol hydrolase: role in intracellular lipid metabolism, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:1633–1651, **2004**.
- [141] Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T., Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*, 12(10), 1161-1208., **2005**.
- [142] Eken, A., Rat kan ve doku örneklerinde oksidatif stres parametreleri, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, **2010**.
- [143] Ezemonye, L., Tongo, I., Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*), *Chemosphere*, 81(2):214-7, **2010**.
- [144] Costantini, D., Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies, *Ecology Letters*, 11: 1238-1251, **2008**.
- [145] Richardson, K.L., Gold-Bouchot, G., Schlenk, D., The characterization of cytosolic glutathione transferase from four species of sea turtles: loggerhead (*Caretta caretta*), green (*Chelonia mydas*), olive ridley (*Lepidochelys olivacea*), and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*), *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(2):279-84, **2009**.
- [146] Aguilera, C., del Pliego, P.G., Alfaro, R.M., Lazcano, D., Cruz, J., Pollution biomarkers in the spiny lizard (*Sceloporus* spp.) from two suburban populations of Monterrey, Mexico, *Ecotoxicology*, 21(8):2103-12, **2012**.
- [147] Amaral, M.J., Bicho, R.C., Carretero, M.A., Sanchez-Hernandez, J.C., Faustino, A.M., Soares, A.M., Mann, R.M., The use of a lacertid lizard as

a model for reptile ecotoxicology studies: part 2--biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards, *Chemosphere*, 87(7):765-74, **2012**.

- [148] Elia, A.C., Galarini, R., Dörr, A.J.M., 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**.
- [149] Labrada-Martagón, V., Rodríguez, P.A., Méndez-Rodríguez, L.C., Zenteno-Savín, T., Oxidative stress indicators and chemical contaminants in East Pacific green turtles (*Chelonia mydas*) inhabiting two foraging coastal lagoons in the Baja California peninsula, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(2):65-75, **2011**.
- [150] Ramos-Vasconcelos, G.R., Hermes-Lima, M., Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*, *The Journal of Experimental Biology*., 206(Pt 4):675-85, **2003**.
- [151] Ahmed, R.G., Is There A Balance Between Oxidative Stress And Antioxidant Defense System During Development? *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*, 15:2, 55-63, **2005**.
- [152] Berglund, A.M., Sturve, J., Förlin, L., Nyholm, N.E., Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden, *Environmental Research*, 105(3):330-9, **2007**.
- [153] Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., Stěpánová, S., Svobodová, Z., Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine, *Food and Chemical Toxicology*., 61:82-5., **2013**.
- [154] Ott, J.A., Mendonça, M.T., Guyer, C., Michener, W.K., Seasonal changes in sex and adrenal steroid hormones of gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*), *General and Comparative Endocrinology*., 117(2):299-312, **2000**.
- [155] Mahmoud, I.Y., Licht, P., Seasonal changes in gonadal activity and the effects of stress on reproductive hormones in the common snapping

turtle, *Chelydra serpentina*, *General and Comparative Endocrinology* 107(3):359-72, **1997**.

- [156] Sereau, M., Lagarde, F., Bonnet, X., El Mouden, el H., Slimani, T., Dubroca, L., Trouvé, C., Dano, S., Lacroix, A., Does testosterone influence activity budget in the male Greek tortoise (*Testudo graeca graeca*)?, *General and Comparative Endocrinology*., 167(2):181-9, **2010**.
- [157] Wibbels, T., Owens, D.W., Limpus, C.J., Reed, P.C., Amoss, M.S. Jr., Seasonal changes in serum gonadal steroids associated with migration, mating, and nesting in the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), *General and Comparative Endocrinology*, 79(1):154-64, **1990**.
- [158] Currylow, A.F., Tift, M.S., Meyer, J.L., Crocker, D.E., Williams, R.N., Seasonal variations in plasma vitellogenin and sex steroids in male and female Eastern Box Turtles, *Terrapene carolina Carolina*, *General and Comparative Endocrinology*, 180:48-55, **2013**.

# ÖZGEÇMİŞ

## Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: MEHMET KÜRŞAT ŞAHİN

Doğum Yeri: LADİK

Medeni Hali: BEKAR

E-posta: kursat.sahin@hacettepe.edu.tr

Adresi: H.Ü. Biyoloji Bölümü, Zooloji ABD, Beytepe Kampüsü ANKARA

## Eğitim

Lise: Erzurum Anadolu Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı

## Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- Advanced (ileri)

## İş Deneyimi

**09.2010-05.2011:** Araştırma Görevlisi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Karaman

**05.2011- ...:** Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara

## Deneyim Alanları

Ekotoksikoloji, ekofizyoloji, sürüngen biyolojisi, koruma biyolojisi

## Tezden Üretilmiş Proje ve Bütçesi

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Destek miktarı:9.998 TL'dir.

## Tezden Üretilmiş Yayınlar (-)


## Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Mehmet Kürşat Şahin, Juan Carlos Sanchez-Hernandez, Gönül Arslan, Dürdane Kolankaya, "Kapadokya Bölgesi Kara Kaplumbağaları (*Testudo graeca*) nın Kolinesteraz Enzim Aktivitesinin Mevsimsel Değişimine Ekotoksikoproteomik Yaklaşım", 20-21 Mayıs 2013, ÖYP Kongresi II, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, Türkiye

## EKLER

### Ek-1

## ETİK KURUL BELGESİ

 **HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 - Faks: 0 (312) 310 0581  
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index\_bdk.php

Sayı: B.30.2.HAC.0.05.06.00/364

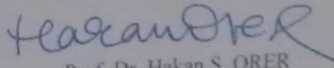
28 Mayıs 2012

**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI**

TOPLANTI TARİHİ	: 25.05.2012 (CUMA)
TOPLANTI SAYISI	: 2012/4
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2012/33
KARAR NUMARASI	: 2012/33-05
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Dürdane Kolankaya
HAYVAN DENEYLERİNDEN	
SORUMLU ARAŞTIRMACI	: Arş. Gör. Cansın Güngörmüş
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Arş. Gör. Mehmet Kürşat Şahin
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 50 adet Testudo Graeca (Kara Kaplumbağa)
ONAY GEÇERLİLİK SÜRESİ	: 12 ay

Üniversitemiz Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden. Prof. Dr. Dürdane Kolankaya'nın araştırma yürütücüsü olduğu 2012/33 kayıt numaralı "*Kapadokya Bölgesi (Nevşehir) Kara Kaplumbağalarını (Testudo Graeca, Linnaeus, 1758) Tehdit Eden Bazı Çevresel Kontaminantların Belirlenmesi ve Bazı Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür

  
Prof. Dr. Hakan S. ORER  
Etik Kurul Başkanı