

Araştırma Makalesi /Research Article

Klorpirifos Etilin *in vitro* Tatlı Su Model Organizmaları Üzerine Oksidatif Stres Etkisinin Belirlenmesi

Determination of The Oxidative Stress Effect of Chlorpyrifos Etyhl on the *in vitro* Models of the Freshwater Organisms

Pınar Arslan

Çankırı Karatekin Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Çankırı, Türkiye

Öz

Amaç: Organofosfatlı insektisitlerden biri olan klorpirifos etil, genellikle tarımsal üretimde mısır, pamuk ve meyve ağaçlarındaki pestlere karşı kullanılsa da sucul ekosistemleri kontamine eden etkenlerden biridir. Sucul organizmalardan özellikle balıklar üzerinde oldukça toksik etkilere neden olan klorpirifos etilin sucul omurgasızlar üzerinde de etkisinin detaylı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Sucul organizmalarla yapılan çalışmaların genellikle *in vivo* çalışmalar oldukları görülmektedir. Bu çalışmada, tatlı su omurgasızlarından midye ve istakoz türlerinden elde edilen *in vitro* primer hücre kültürleri kullanılarak klorpirifos etilin oksidatif stres üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Midyelerin solungaç ve sindirim bezi ile istakozların solungaç ve hepatopankreas dokularının alınmasını takiben primer hücre kültürleri enzimatik olarak tripsin kullanılarak elde edilmiştir. Ardından hücrelerin mikropalakalara ekimini takiben 24 saat süre ile 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L konsantrasyonlarında klorpirifos etil (CPE) maruziyetine kalmışlardır. Oksidatif stres etkisi ileri oksidatif protein ürünleri (AOPP) ölçümü ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Primer midye solungaç hücre kültüründe kontrol grubuna göre 1 mg/L, 10 µg/L ve 100 ng/L konsantrasyonlarında CPE maruziyetinde AOPP değerlerinde düşme meydana gelmiştir. Primer midye sindirim bezi hücre kültüründe ise en yüksek AOPP değeri 10 µg/L CPE uygulanan grupta elde edilmiştir ($p<0.005$). Tatlı su istakozlarından elde edilen primer solungaç hücre kültüründe CPE uygulanan gruplarda AOPP değerleri doz azaldıkça artma göstermektedir ($p<0.005$). Primer hepatopankreas hücre kültürleri 1 mg/L ve 10 µg/L CPE doz uygulanan gruplarda kontrol grubu AOPP değerlerine göre bir düşme meydana geldiği gözlenmiştir ($p<0.005$).

Sonuç: Kirlenici maddelerin etkisinin araştırılmasında primer tatlı su midye ve tatlı su istakoz hücre kültürlerinin sucul toksikoloji alanında iyi bir model olduğu gözlenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Klorpirifos etil, tatlı su midyesi, tatlı su istakozu, primer hücre kültürü, AOPP

Abstract

Objective: Although chlorpyrifos ethyl, one of the organophosphate insecticides, is generally used against pests on corn, cotton and fruit trees in agricultural production, it is one of the factors that contaminate aquatic ecosystems. The effect of chlorpyrifos ethyl, which causes highly toxic effects on aquatic organisms, especially fish, on aquatic invertebrates should be investigated in details. Studies with aquatic organisms are generally seen as *in vivo* studies. In this study, it was aimed to investigate the effect of chlorpyrifos ethyl on oxidative stress by using *in vitro* primary cell cultures obtained from freshwater invertebrates, mussel and crayfish species.

Materials and Methods: Primary cell cultures were obtained enzymatically using trypsin following the removal of gill and digestive glands of mussels and gill and hepatopankreas tissues of crayfish. Then, following the seeding of the cells in microplates, they were exposed to chlorpyrifos ethyl at concentrations of 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L, and 1 ng/L for 24 hours. The effect of oxidative stress was evaluated by the advanced oxidation protein products method (AOPP).

Results: In primary mussel gill cell culture, AOPP values decreased in CPE exposure at concentrations of 1 mg/L, 10 µg/L and 100 ng/L compared to the control group. In primary mussel digestive gland cell culture, the highest AOPP value was obtained in the group treated with 10 µg/L CPE ($p<0.005$). In primary gill cell culture derived from freshwater crayfish, AOPP values increased as the dose decreased in the groups exposed with CPE ($p<0.005$). It was observed that there was a decrease in the AOPP values of 1 mg/L and 10 µg/L CPE groups compared to control in the primary hepatopankreas cell cultures ($p<0.005$).

Conclusion: Primary freshwater mussel and freshwater crayfish cell cultures are good models in the field of aquatic toxicology in investigating the effects of pollutants.

Key Words: Chlorpyrifos ethyl, freshwater mussel, freshwater crayfish, primary cell culture, AOPP

GİRİŞ

Karasal ve sucul ekosistemde yaşayan canlılar arasında yer alan omurgasızlar zengin bir tür çeşitliliğine sahip olup çevresel kirleticilerin zararlı etkilerine maruz kalmaktadırlar¹. Bu çevresel kirletici madde gruplarından biri olan organofosforlu pestisitler nörotoksik olup nöronal asetilkolinesterazları inhibe ederek etki gösterirler².

Klorpirifos-etil organofosforlu pestisit grubuna dahil bir maddedir³. Kullanım alanının büyük bir kısmı mısır, pamuk ve meyve ağaçlarındaki haşerelere karşı olsa da sucul ekosisteme karışması ile hedef dışı sucul organizmalar üzerinde de istenmeyen etkiler göstermektedir⁴. Tatlı su balıkları üzerinde davranışsal değişimler^{3,4} ve biyokimyasal biyobelirteçlerin değişimleri^{5,6}; tatlı su omurgasızları üzerinde de biyokimyasal değişimler^{7,8} gibi çeşitli etkilere neden olmaktadır. Ayrıca sucul ekosistemin su ve sediment örneklerinde de birikim gösterme eğilimindedir. Naivasha Gölü (Nijerya)'nde yapılan bir çalışmada kuru mevsimlerde yapılan örneklemelerde sedimentte 4,7-17,4 ng/g ve yağışlı mevsimlerdeki örneklemelerde ise 11,2-30,1 ng/g aralıklarında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiştir. Su örneklerinde ise kuru sezonda 14 µg/L iken yağışlı sezonda 8,8-26,6 µg/L aralıklarında tespit edilmiştir⁹.

Sucul toksikoloji çalışmalarında artan güvenilirliği ve duyarlılığı nedeniyle hücre kültürü kullanımı ilgili biyolojik mekanizmaların (hücre canlılığı, biyokimyasal parametreler gibi) analizi ve risk değerlendirilmesi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır¹⁰. Bu kapsamda kullanılan primer hücre kültürleri, organizmadan alınan taze dokudan enzimatik yollar ile hücrelerin elde edilmesine dayanan bir kültür çeşididir. Primer hücre kültürlerindeki heterojen hücre yapısı incelendiğinde izole edildikleri organdaki hücreler ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenle hem *in vitro* hem *in vivo* özellik gösterirler¹¹.

Sucul toksikoloji çalışmalarında sucul omurgasız canlılardan olan tatlı su midyeleri^{12,13,14,15,16} ve tatlı su istakozları^{17,18,19} yoğun olarak kullanılmaktadır. Bu canlıların çeşitli dokularından primer hücre kültürlerinin

geliştirilmesi ile birlikte sucul toksikolojide kullanımları artan bir öneme kavuşmuştur^{12,19}. Bu nedenle bu çalışmada, sucul indikatör türlerden tatlı su midyeleri ve tatlı su istakozlarının primer solungaç ve sindirim bezi/hepatopankreas hücre kültürleri kullanılarak *in vitro* modeller üzerinde klorpirifos-etilin oksidatif stres etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tatlı su organizmalarının temini

Bu çalışmada, ülkemiz tatlı sularında bulunan türlerden tatlı su midye türü olarak *Unio delicatus* ve tatlı su istakozu olarak *Astacus (Pontastacus) leptodactylus* tercih edilmiştir. Tatlı su midyeleri Gölbaşı Gölü (Adıyaman)'nden ve tatlı su istakozları Hirfanlı Baraj Gölü (Ankara)'nden temin edilmiştir.

Deneylerde ortalama 35.67±1.80 g ağırlığında, 5.33±0.18 cm uzunluğunda, 2.02±0.03 cm yüksekliğinde ve 1.48±0.08 cm kalınlığında üç adet tatlı su midyesi ile 28.67±1.34 g ağırlığında ve 11.86±2.01 cm uzunluğunda üç adet tatlı su istakozu kullanılmıştır. Organizmalar optimum şartlarda laboratuvara getirilerek iki hafta süreyle 15 L'lik akvaryumlarda kloru arındırılmış ve havalandırılması sağlanmış çeşme suyu içerisinde laboratuvar ortamına adapte edilmişlerdir. Bu süreçte tatlı su midyeleri *Chlorella* sp. ile tatlı su istakozları ise *ad libitum* taze ölmüş balıklar ile beslenmiştir.

Primer Hücre Kültürü Yapımı

Primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürleri tatlı su midyelerinden Yurdakök-Dikmen vd. (2018) metoduna göre yapılmıştır¹². Primer solungaç ve hepatopankreas hücre kültürleri ise tatlı su istakozlarından Yurdakök-Dikmen vd. (2020) metoduna göre yapılmıştır¹⁹.

Bu metodlara göre kısaca primer hücre kültürleri şu şekilde yapılmıştır. Steril bir ortamda disekte edilerek alınan dokular steril pens ve bisturi ile mekanik olarak 3-5 mm'lik parçalara bölünmüştür. Ardından enzimatik parçalamaya için dokuların üzerine 4 mL tripsin (0.25% in DBPS, Capricorn Scientific, Germany), mikroorganizma

kontaminasyonunu engellemek için 500 µL 1X penisilin-streptomisin (100X, Capricorn Scientific, Germany) ve 100 µL 1X amphotericin B (100X, Capricorn Scientific, Germany) ve hücre besin ve büyüme faktörü içerdiği için 500 µL fetal sığır serumu (Capricorn Scientific, Germany) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 4 saat inkübasyonu takiben 5 mL %10 FBS içeren hücre mediumu Leibovitz 15 (Sigma Aldrich, USA) eklenerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, doku-hücre karışımı pipetlenerek cell strainer (100µm mesh size, NEST) ile süzülüş ve santrifüje edilmiştir. Santrifüden sonra hücre peleti 1 mL %10 FBS içeren L-15 içinde resüspanse edilerek 24 kuyucuklu mikrolakalara 1×10^5 hücre olacak şekilde hücreler ekilmiştir.

Klorpirifos etil dozlarının hazırlanması

Deneylerde CAS numarası 2921-88-2 olan klorpirifos etil kullanılmıştır. Balon joje içinde dimethylesulphoxide (DMSO) kullanılarak stok konsantrasyonu 100 mg/L olacak şekilde hazırlanan klorpirifos etilin primer hücre kültürlerine uygulanacak konsantrasyonları 1 mg/L, 10µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L olacak şekilde Leibovitz 15 kullanılarak elde edilmiştir.

Hücre deneyleri

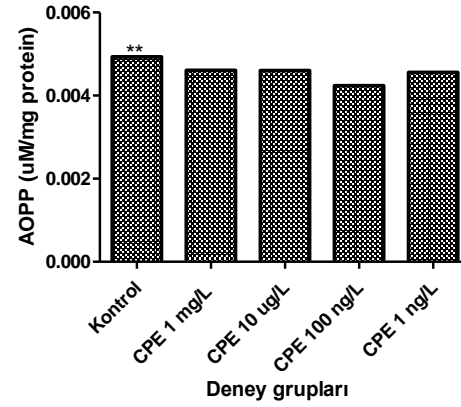
Tatlı su organizmalarının primer hücre kültürleri mikrolakalara ekildikten 24 saat sonra hazırlanan klorpirifos etil konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılmıştır. Mikrolakalarda kontrol ve solvent olmak üzere iki adet kontrol grupları bulunmaktadır. Maruziyet sonrasında mikrolakalardaki hücre mediumları alınarak hücreler tripsin ile kaldırılmış ve santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı atılan hücre peletlerinde ileri oksidatif protein ürünleri (AOPP) Witko-Sarsat (1996)²⁰ metoduna göre çalışılmıştır. Hücrelerdeki protein düzeyi Bradford yöntemi²¹ ile tayin edilmiştir.

Deney sonuçlarının istatistiksel analizi

Primer hücre kültürlerinin AOPP ve protein spektrofotometre okuma sonuçlarının Microsoft Excel 13 programına girilmesinin ardından ortalama değerleri alınarak GraphPad Prism 5 programında Two-way ANOVA analizi ile istatistiksel olarak değerlendirme yapılmıştır.

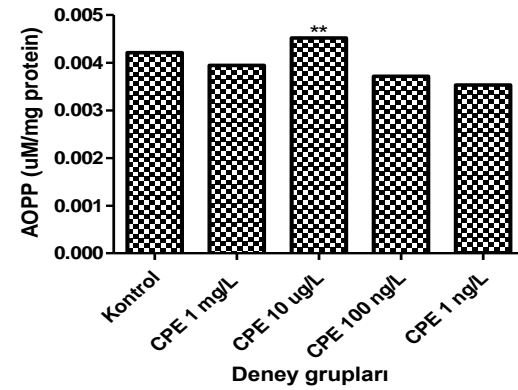
BULGULAR

Primer midye solungaç ve sindirim bezi hücre kültürlerinin 1 mg/L, 10 µg/L, 100 ng/L ve 1 ng/L dozlarında klorpirifos etile 24 saatlik maruziyeti sonucunda elde edilen AOPP değerleri Şekil 1 ve Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 1. Primer midye solungaç hücre kültürlerinin AOPP değerleri (**: $p < 0.005$)

Primer midye solungaç hücre kültürlerinde kontrol grubu AOPP değerlerinin klorpirifos etile maruz kalan hücre gruplarından yüksek olduğu gözlenmektedir. 1 mg/L, 10 µg/L ve 100 ng/L dozları uygulanan gruplarda kontrole göre AOPP değerinde bir düşme meydana gelmiştir. 1 ng/L uygulanan grupta ise kontrolden düşük ancak 100 ng/L doz grubundan yüksek değer elde edilmiştir ($p < 0.005$).

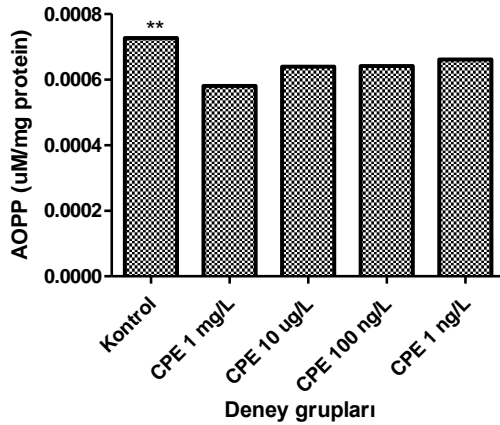


Şekil 2. Primer midye sindirim bezi hücre kültürlerinin AOPP değerleri (**: $p < 0.005$)

Primer midye sindirim bezi hücre kültürlerinde ise 10 µg/L doza maruz kalan grupta diğer doz grupları ve kontrol grubuna göre yüksek AOPP değeri elde edilmiştir ($p < 0.005$)

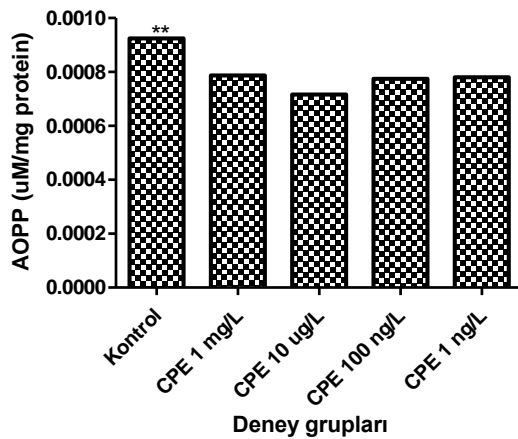
Primer solungaç hücre kültürü kontrol ve 1mg/L AOPP değerlerinin primer sindirim bezi hücre kültürlerinden 1.2 kat; 1 ng/L grubu değerlerinin ise 1.3 kat yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$).

Çalışmanın diğer bir hücre kültürü modeli olan primer tatlı su istakozu solungaç ve hepatopankreas hücre kültürlerinin klorpirifos etile 24 saatlik maruziyeti sonucunda elde edilen AOPP değerleri Şekil 3 ve Şekil 4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. Primer tatlı su istakozu solungaç hücre kültürlerinin AOPP değerleri (**: $p<0.005$)

Primer tatlı su istakozu hücre kültüründe kontrol grubunda yüksek AOPP değeri elde edilmesine karşın CPE uygulanan gruplarda doz konsantrasyonu azaldıkça AOPP düzeylerinin arttığı gözlenmiştir ($p<0.005$).



Şekil 4. Primer tatlı su istakozu hepatopankreas hücre kültürlerinin AOPP değerleri (**: $p<0.005$)

Primer tatlı su istakozu hepatopankreas hücre kültüründe de kontrol grubunda en yüksek

AOPP değeri gözlenmiştir. 1 mg/L ve 10 µg/L CPE doz gruplarında ise kontrole göre azalma görülmüştür ($p<0.005$).

Primer hepatopankreas hücre kültürü AOPP değerleri primer solungaç hücre kültürleri değerlerinden 100 ng/L ve 1 ng/L CPE uygulanan gruplarda 1.2 kat; kontrol grubunda 1.3 kat olduğu ve 1 mg/L CPE uygulanan grupta 1.4 kat yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

TARTIŞMA

Sucul ekosistemin kirlilik kaynaklarından biri olan klorpirifos etil sucul canlılar üzerinde çeşitli etkilere neden olmaktadır^{3,4,5}.

Çalışmamızda, tatlı su organizmalarından midye (*Unio delicatus*) primer solungaç ve sindirim bezi hücre kültürü ile istakoz (*Astacus leptodactylus*) primer solungaç ve hepatopankreas hücre kültürü modelleri üzerinde klorpirifos etilin etkisi in vitro olarak oksidatif stres parametrelerinden ileri oksidatif protein ürün miktarı tespit edilerek değerlendirilmiştir.

Zebra midyeleri *Dreissena polymorpha* ile yapılan in vivo klorpirifos maruziyet çalışmasında ise midye solunum hızı 0.45 µg, 0.75 µg ve 1.5 µg klorpirifos doz gruplarında doza paralel olarak arttığı gözlenmiştir. Solungaç aktivitesinin yüksek olması nedeniyle ortamdaki kirletici stresine solunum hızı ile cevap vermektedir²².

Bu çalışmada in vitro *P. leptodactylus* solungaç modelinde klorpirifos etil değerleri düşük bulunmuşken hepatopankreas değerlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durum her iki dokunun ksenobiyotik metabolizmasının farklılık göstermesinden kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır^{17,19}. *Procambarus clarkii* ile yapılan in vivo çalışmada 2 ve 7 günlük klorpirifos maruziyeti katalaz ve okside glutasyon seviyesi düşerken glutasyon-S-transferaz seviyesinin arttığı tespit edilmiştir⁸.

Pontastacus leptodactylus ile yapılan in vivo çalışmada 21 günlük 5µg/L klorpirifos maruziyeti hemolemf γ-glutamilttransferaz düzeylerini arttırmıştır⁷.

Cyprinus carpio ile yapılan in vivo klorpirifos 96 ve 240 saatlik 0.13 ve 0.26 mg/L dozlarında maruziyetinde beyin dokusu AOPP düzeylerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken 240 saatlik maruziyet sonucunda protein karbonil düzeylerinde artma meydana gelmiştir. 240 saatlik 0.26 ve 0.52 mg/L

dozlarına maruziyet sonucunda malondialdehit seviyesinde artma meydana gelirken süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz aktiviterinde azalma meydana gelmiştir²³. *Clarias gariepinus* ile yapılan bir çalışmada ise 8 hafta boyunca 0.045 mg/L, 0.096 mg/L ve 0.192 mg/L CPE maruziyeti serum glukoz, protein, kolesterol, trigliserid, glutamik pirüvik asit transaminaz, glutamik oksaloasetik asit transaminaz ve alkalın fosfotaz düzeylerinde değişimlere neden olmuştur²⁴.

Reaktif oksijen türlerinde meydana gelen serbest radikaller ve oksidantların hedeflerinden biri proteinlerdir^{23,25}. İleri oksidatif protein ürünlerinin tespiti Witko-Sarsat ve ark.'nın tanımladığı spektrofotometrik yöntem esas alınarak modifikasyonlar yapılarak ölçülmüştür^{20, 26}. Çalışmamızda *in vitro* olarak AOPP değerlerinin CPE maruziyetine bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Primer hücre kültürleri taze dokudan elde edilmiş hücre kültürleri olması nedeniyle hücre hatlarına göre birden çok hücre topluluğu içerebilirler. Birden fazla hücre tipi içermesi hem *in vivo* hem de *in vitro* karakterlere sahip olduğunu göstermektedir²⁷.

SONUÇ

Bir pestisit olan klorpirifos etilin hedef dışı organizmalar olan tatlı su midye ve istakozu türlerindeki etkisi bu türlerin primer hücre kültürleri kullanılarak bir protein oksidasyon yöntemi ile araştırılan bu çalışmada AOPP değerlerinde doza bağımlı olarak kontrol gruplarına göre farklı oranda azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Doz bağı *In vitro* bir sistem olan primer hücre kültürlerinde meydana gelen bu değişimler, bu sistemlerin çevresel kirletici maddelerin biyokimyasal parametrelerdeki etkilerinin araştırılmasında kullanılan bir model olabileceği gösterilmiştir.

Etik Onay: -

Çıkar Çatışması: Yazar çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Finansal Destek: Bu çalışma kısmi olarak Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi (Proje numarası FF210621B12) tarafından desteklenmiştir.

Ethical Approval: -

Conflict of Interest: Author declared no conflict of interest.

Financial Support: This study was partially supported by the Scientific Research Unit of Çankırı Karatekin University (Project number FF210621B12).

KAYNAKLAR

- Hutchinson, T.H. Reproductive and developmental effects of endocrine disrupters in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters*, 2002;131(1–2), 75-81. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00046-2](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00046-2)
- Gultekin, F., Ozturk, M., Akdogan, M. The effect of organophosphate insecticide chlorpyrifos-ethyl on lipid peroxidation and antioxidant enzymes (in vitro). *Archives of Toxicology*, 2000;74, 533-538. <https://doi.org/10.1007/s002040000167>
- Okechukwu, O.E., Usman, I.B., Jehu, A. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-ethyl on *Clarias gariepinus* – (Burchell, 1822) using some behavioural indices. *International Journal of Basic and Applied Sciences*, 2013;2(2), 176-183. <https://doi.org/10.14419/ijbas.v2i2.778>
- Halappa, R., David, M. Behavioural Responses of the Freshwater Fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) Following Sublethal Exposure to Chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009;9, 233-238. <https://doi.org/10.4194/trjfas.2009.0218>
- Oruc, E. Oxidative Stress Responses and Recovery Patterns in the Liver of *Oreochromis niloticus* Exposed to Chlorpyrifos-Ethyl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012;88, 678–684. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0548-4>
- Özcan Oruç, E. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2010;96(3), 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.11.005>
- Banaee, M., Akhlaghi, M., Soltanian, S., Sureda, A., Gholamhosseini, A., Rakhshaninejad, M. Combined effects of exposure to sub-lethal concentration of the insecticide chlorpyrifos and the herbicide glyphosate on the biochemical changes in the freshwater crayfish *Pontastacus leptodactylus*. *Ecotoxicology*, 2020;29, 1500–1515. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02233-0>
- Vioque-Fernández, A., de Almeida, E.A., López-Barea, J. Biochemical and proteomic effects in *Procambarus clarkii* after chlorpyrifos or carbaryl exposure under sublethal conditions. *Biomarkers*, 2009;14(5), 299-310. <https://doi.org/10.1080/13547500902913211>
- Otieno, P.O., Schramm, K.W., Pfister, G., Lalah, J.O., Ojwach, S., Virani, M. Spatial Distribution and Temporal Trend in Concentration of Carbofuran, Diazinon and Chlorpyrifos Ethyl Residues in Sediment and Water in Lake Naivasha, Kenya. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012;88, 526–532. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0529-7>
- Poteser, M. Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. *Biomonitoring*, 2017;4(1), 11-26. <https://doi.org/10.1515/bimo-2017-0002>

11. Allahverdiyev, A.M. Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul. 2018.
12. Yurdakök-Dikmen, B., Arslan, P., Kuzukıran, Ö., Filazi, A., Erkoç, F. *Unio* sp. primary cell culture potential in ecotoxicology research. *Toxin Reviews*, 2017;37(1), 75–81. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1331360>
13. Trešňáková, N., Günal, A.Ç., Başaran Kankılıç, G., Paçal, E., Tavşanoğlu, Ü.N., Uyar, R., et al. Sub-lethal toxicities of zinc pyriithione, copper pyriithione alone and in combination to the indicator mussel species *Unio crassus* Philipsson, 1788 (Bivalvia, Unionidae). *Chemistry and Ecology*, 2020;36(4), 292-308. <https://doi.org/10.1080/02757540.2020.1735377>
14. Yurdakök Dikmen B, Filazi A, Arslan P. Ekotoksikolojide Omurgasız Hücre Kültürlerinin Kullanımı. Güvenç D, editör. İlaç Araştırma, Geliştirme ve Toksikolojik Çalışmalarda Kullanılan Alternatif Yöntemler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 2018; 58-64.
15. Arslan, P., Yurdakök-Dikmen, B., Ozeren, S.C., Kuzukıran, O., Filazi, A. In vitro effects of erythromycin and florfenicol on primary cell lines of *Unio crassus* and *Cyprinus carpio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021;28, 48408–48416. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14139-3>
16. Arslan, P., Yurdakök-Dikmen, B., Kuzukıran, O., Ozeren, S.C., Filazi, A. Effects of acetamiprid and flumethrin on *Unio* sp. primary cells. *Biologia*, 2021;76, 1359–1365. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00692-2>
17. Günal, A.Ç., Tunca, S.K., Arslan, P., Gül, G., Sepici Dinçel, A. How does sublethal permethrin effect non-target aquatic organisms?. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021;28, 52405–52417. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14475-4>
18. Karasu Benli, A.Ç., Şahin, D., Sarıkaya, R., Koçak Memmi, B., Sepici Dinçel, A. The sublethal effects of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823). *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 2016;67(4), 289-296. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2793>
19. Yurdakök Dikmen, B., Turgut, Y., Günal, A.Ç., Uyar, R., Filazi, A., Erkoç, F. In vitro effects of selected endocrine disruptors (DEHP, PCB118, BPA) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) primary cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2020;56, 783–791. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00514-w>
20. Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A.T., et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 1996;49(5), 1304-1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
21. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976;72, 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
22. Yancheva, V., Mollov, I., Georgieva, E., Stoyanova, S., Tsvetanova, V., Velcheva, I. Ex situ Effects of Chlorpyrifos on the Lysosomal Membrane Stability and Respiration Rate in Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). *Acta Zoologica Bulgarica*, 2017;8, 85-90.
23. Berkoz, M., Ozkan-Yilmaz, F., Ozluer-Hunt, A., Gunduz, S. G., Yildirim, M., Yalin, S. Influence of sublethal chlorpyrifos exposure on oxidative stress and acetylcholinesterase activity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 2019; 4642.
24. Ogueji, E.O., Auta, J. Effects of Sub-lethal Doses of Chlorpyrifos-ethyl on Some Biochemical Parameters of African Catfish *C. garieoinus*. *Global Journal of Pure and Applied Sciences*, 2007;13(3), 369-372. <https://doi.org/10.4314/gipas.v13i3.16720>
25. Altan, N., Sepici Dinçel, A., Koca, C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006;31(2), 51-56.
26. Büyükgüzel, E. Protein Oksidasyonun Biyokimyasal ve Moleküler Mekanizması. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2013;3(1), 40-51.
27. Allahverdiyev, A.M. Somatik ve Kök Hücre Kültür Sistemlerinin Temel İlkeleri. Nobel Tıp Kitapevleri. İstanbul. 2018.