

2,4-D Diklorofenoksi Asetik Asit Maruziyeti Sonrasında Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Değişimlerin Belirlenmesi[&]

Naime Filiz KARADAŞ^{*1}, Veysel PARLAK², Muhammed ATAMANALP³

¹Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su ürünleri Mühendisliği Bölümü, Erzurum

²Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Bölümü, Erzurum

³Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Yetiştiricilik Bölümü, Erzurum

*Sorumlu Yazar: naimefilizkaradas@gmail.com

Geliş Tarihi: 11.04.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 28.05.2021 Kabul Tarihi: 02.07.2021

Öz

2,4-D diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) dünya genelinde yaygın olarak kullanılmakta olan bir herbisit olup, tarımsal mücadelede yabancı otları elimine etmekte kullanılır. 2,4-D ve formlarının balıklar üzerinde yarattığı toksik etki diğer sucul canlılar üzerinde oluşan toksik etkiden bir hayli fazladır. Bu çalışmada 2,4-D Diklorofenoksi asetik asit herbisitinin gökkuşluğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulama sonrasında zamana bağlı olarak enzim parametrelerinde (MDA, GPx, SOD, CAT) artış belirlenirken doz, zaman ve doz x zaman etkileşimlerinin etkileri ise çok önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Hematolojik parametrelerden ise lökosit, trombosit, MCV ve MCHC değerleri için doz, zaman ve doz x zaman etkileşim etkileri çok önemli bulunurken ($p<0.01$) diğer parametreler için sadece zaman ve doz önemli bulunmuştur ($p<0.05$).

Anahtar kelimeler: 2,4-D Diklorofenoksi asetik asit, Gökkuşluğu alabalığı, Hematolojik parametre, Enzim aktivitesi, Toksikoloji

Determination of Some Hematological and Biochemical Effect in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to 2,4-D Dichlorophenoxy Acetic Acid

Abstract

2,4-D dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) is a widely used herbicide throughout the world and it is used to eliminate weeds in agricultural control. The toxic effect of 2,4-D and its forms on fish is much higher than the toxic effect on other aquatic organisms. In this study, We investigated the effect of 2,4-D dichlorophenoxy acetic acid herbicide on the biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). While an increase in enzyme parameters (MDA, GPx, SOD, CAT) was determined after the exposure, effects of dose, time and dose x time interactions were found to be very important ($p < 0.01$). Among the hematological parameters, dose, time and dose x time interaction effects were found to be very important for leukocyte, platelet, MCV and MCHC values ($p < 0.01$), while only time and dose were found important for other parameters ($p < 0.05$).

Key words: 2,4-D Dichlorophenoxy acetic acid, Rainbow trout, Hematological parameter, Enzyme activity, Toxicology

Giriş

Pestisitler kolay uygulanması ve kısa sürede etki göstermesi nedeniyle tarımsal alanlarda yoğun olarak tercih edilmektedir. Tarım alanlarında yoğun bir şekilde kullanılan pestisitler, kronik ve akut uygulamalar sonucunda ekosisteme karışarak doğal dengeyi bozmaktadır. Doğal ortama yayılan pestisitler, hedef dışı canlılarda toksik özelliكتedir (Tokmak, 2020). Meydana gelen su ve toprak kirliliği birçok bulaşıcı hastalığın yayılmasına neden olmaktadır (Tiryaki, 2010; Parlak, 2019). Pestisitler, sucul ortamlara, doğrudan atık sular, nehir ve ırmaklar ya da atmosferik taşınım yolu ile kontamine olmakta ve besin zinciri aracılığıyla insanlara kadar ulaşabilmektedir (Korkmaz ve ark., 2020).

Herbisitler, zararlı bitkilerin gelişimlerini engelleyen ve onları yok eden kimyasal maddelerdir. 2,4-D yaklaşık olarak 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılmakta olan bir herbisittir (Özdaş ve ark., 2006). 2,4-D'nin sulara geçişi, ilaçlama sonrası havaya karışmasıyla ve yağmurlarla birlikte tekrar sulara girmesiyle gerçekleşir. 2,4-D'nin suda çözünürlük oranının yüksek olması sebebiyle, hedef dışı organizmaları etkilemesi de yüksek oranda gerçekleşmektedir. Sucul ortamlara karışma riski fazla olan bu kimyasalların, bu ortamda yaşamakta olan canlılara ve besin zincirine olan etkilerini belirlemek için balıklar üzerinde yapılan toksisite testleri büyük bir öneme sahiptir (Parlak ve Atamanalp, 2017). Dünya genelinde büyük bir öneme sahip olan gökkuşağı alabalıkları sucul ortamdaki önemli indikatörlerden biridir. Balıklar buldukları ortamda meydana gelen kirlilik ve stres faktörlerinden etkilenmektedir. Ayrıca hastalıkların teşhisinde ve çevresel kirliliğin izlenmesinde balıklar diğer türlere göre daha fazla avantaj sağlamaktadır (Freyhof ve Brooks, 2011; Parlak, 2019). Araştırmalarda kullanılan hematolojik ve biyokimyasal parametreler de bu avantajlardan biridir. Biyokimyasal ve hematolojik parametreler balıklarda fizyolojik durumların tespitinde kullanılan çok önemli değerler olup bu parametrelerin değişimini, balık türü, yaş, üreme, hastalık, beslenme, stres, örnekleme metodu ve çevresel faktörler (sıcaklık, ışık süresi, yoğunluk, tuzluluk) gibi birçok etken belirlenmektedir. Bununla beraber hematoloji parametreleri, balıklardaki toksik etkiyi ortaya çıkarır ve uzun süreli kimyasal kirleticilerle yüz yüze kalma sonuçlarının tahminini geçerli kılmaktadır (Çelik, 2006). Hematoloji parametreleri [eritrosit sayısı (RBC), lökosit sayısı (WBC), hemoglobin değeri (Hb), hematokrit oranı (Hct), trombosit (PLT), ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin (MCH) ve eritrosit

başına düşen ortalama hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)] biyokimyasal ve fizyolojik değişimlerin izlenmesinde oldukça önemli göstergelerdir (Çelik, 2006). Metabolizmanın savunma sistemini oluşturan antioksidan enzimlerden (Malondialdehit (MDA), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), superoksit dismutaz (SOD) parametreleri hücre dengesinin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptir ve indüksiyonları kirleticilere karşı verilen tepkinin bir sonucudur (Doyotte ve ark., 1997; Poljsak ve ark., 2013). Ayrıca bu enzimler reaksiyonların pek çoğunu hızlandıran, protein yapısındaki biyolojik katalizörlerdir (Özdemir, 2011). Çalışmamızın amacı, herbisit olarak kullanılan 2,4-D diklorofenoksi asetik asite maruz bırakılan gökkuşağı alabalıklarında hematolojik ve biyokimyasal değişimlerin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot

Çalışmada Araştırma, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Akvaryum Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan Toksikoloji Deneme Ünitesi ve Su Ürünleri Fakültesi Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Balık materyali, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi İç Su Balıkları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Ortalama ağırlıkları 165 ± 10 gr olan herhangi bir enfeksiyon ya da toksisiteye maruz kalmamış 36 gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kullanılmıştır. Balıklar, Su Ürünleri Fakültesi toksikoloji araştırma ünitesinde yer alan deneme tanklarına alınmıştır. Tanklardan biri kontrol diğer ikisi ise muamele grubu olarak belirlenmiştir. Her tanka 165 ± 10 gr olmak üzere 12 balık gelecek şekilde balıklar yerleştirilmiştir. Balıklar 14 günlük bir aklımasyon periyodundan sonra akut olarak pestisit 2 farklı dozuna maruz bırakılarak 96 saatlik bir uygulamaya tabi tutulmuştur.

Denemede kullanılan kimyasal ve uygulama şekli

Çalışmada diklorofenoksi asetik asit isimli herbisit kullanılmıştır. Bu herbisit ticari bir firmadan temin edilmiştir. Etkili maddesi; 500 g/l 2,4-D asite eşdeğer 2,4 diklorofenoksi asetik asit dimethyl amin tuzudur. Uygulama dozu LC50 96 saat değerlerinden yararlanılmış ve tanklardan her birine bu dozun $\frac{1}{2}$ 'si (0.25 mg/l) (D1) ve diğerine $\frac{3}{4}$ 'ü (0.50 mg/l) (D2) uygulanmıştır. Kimyasal, su hacmi belirlenmiş tanklara, ortamı yenilenen deneyler prosedürüne göre uygulanmıştır (Ünsal, 1998). Denemede kullanılan suyun kimyasal özellikleri Oksijen (O₂): 8.6 ppm, Nitrat (NO₃-): 3.05 mg/L, Amonyak (NH₃): 3.15 mg/L, pH: 7.7 ve Sıcaklık: $9.1 \pm 1^\circ\text{C}$ olarak ölçülmüştür.

Hematoloji analizleri

Balıklardan kan örnekleri, plastik enjektörle kaudal venadan girilerek yaklaşık 4 ml alınmıştır (Greene ve Selivonchick, 1990; Peutz ve ark., 1996; Knoph ve Thorud, 1996; Val ve ark., 1998; Atamanalp, 2000). Örnekler kan parametrelerinin analizi için heparin içeren kan tüplerine alınmıştır. Her gruptaki balıkların tümünden kan örnekleri alınarak çalışılmıştır.

Enzim aktivite ölçümleri

Kan örneklerden elde edilen eritrosit hemolizatları -70 °C'de derin dondurucuda analiz yapıncaya kadar saklanmıştır (Arsova ve ark., 2009). Katalaz aktivitesinin ölçümünde Aebi (1984) metodundan yararlanılmıştır. SOD aktivitesi spektrofotometrede okuma işlemi yapıp, spesifik aktivite (EU/mg protein) hesaplanmıştır (Sun ve ark., 1988). GPx aktivitesi, NADPH'in NADP+'ye yükseltgenmesi esnasındaki absorbandaki değişimin 340 nm'de ölçülmesiyle hesaplanmıştır (Beutler, 1975). Zincirleme reaksiyon olan lipid peroksidasyonu ile sekonder bir ürün olan MDA oluşur. MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95 °C'de

aerobik şartlarda inkübasyona girip pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve oluşan bu kompleks spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülmüştür (Chen, 2016).

İstatistik analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 19.0 istatistik paket programından yararlanılmıştır. Çalışma sonunda gruplara ait elde edilen veriler ANOVA testine tabi tutulmuştur. Farklı bulunan ortalama gruplarının kontrolünde LSD testi kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Çalışma sonucunda değerlendirilen hematoloji parametreleri Çizelge 1'de verilmiştir. Balıklarda toksik etkili kimyasallar gastrointestinal ve solungaç sistem vasıtasıyla vücuda alındıktan sonra doku ve organlara kan aracılığı ile taşındığından ilk olarak kan hücreleri ve eritropoietik dokularda işlevsel ve yapısal bozukluklara sebep olduğu bildirilmiştir (Witeska ve Baka, 2002; Duran, 2011).

Çizelge 1. Denemede kullanılan balıklara ait hematoloji parametreleri

Dozlar	Hb	Hct	RBC	WBC	PLT	MCV	MCH	MCHC
Kontrol	6.51±0.15 ^b	60.08±1.49 ^a	2.14±0.10 ^b	3.19±0.10 ^b	7.92±0.29 ^b	283.78±8.98 ^a	30.82±1.16 ^a	10.97±0.52 ^c
D1	6.87±0.15 ^{ab}	54.87±1.49 ^b	2.56±0.10 ^a	4.00±0.10 ^a	8.08±0.29 ^b	220.93±8.98 ^b	27.56±1.6 ^b	12.64±0.52 ^b
D2	7.17±0.15 ^a	55.00±1.49 ^c	2.80±0.10 ^a	4.45±0.10 ^a	9.92±0.29 ^a	205.13±8.98 ^b	26.52±1.16 ^b	13.70±0.52 ^a
Süre (Saat)	Hb	Hct	RBC	WBC	PLT	MCV	MCH	MCHC
0	6.81±0.18 ^a	58.67±1.84 ^{ab}	2.11±0.13 ^b	3.30±0.13 ^c	7.00±0.36 ^c	279.48±11.09 ^a	32.79±1.43 ^a	11.75±0.65 ^b
24	6.92±0.18 ^a	62.22±1.84 ^a	2.58±0.13 ^a	4.07±0.13 ^b	9.22±0.36 ^{ab}	248.45±11.09 ^b	27.38±1.43 ^b	11.32±0.65 ^b
48	6.80±0.18 ^a	55.06±1.84 ^{bc}	2.78±0.13 ^a	4.57±0.13 ^a	9.78±0.36 ^a	206.13±11.09 ^c	24.83±1.43 ^b	12.68±0.65 ^{ab}
96	6.87±0.13 ^a	50.67±1.30 ^c	2.53±0.09 ^a	3.59±0.09 ^c	8.56±0.25 ^b	212.38±7.84 ^c	28.19±1.01 ^b	14.02±0.46 ^a

a, b, c ↓ aynı uygulama içinde farklı zaman seviye ortalamalarının karşılaştırılması.

Gökkuşluğu alabalığında pestisit farklı doz ve zaman sinerji etkisinin belirlenmesine yönelik yapılan bu çalışmada hematoloji parametreleri incelenmiştir.

Hemoglobin değerinde yapılan analiz sonuçları incelendiğinde, doz etkisinin hemoglobin üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (p<0.05). Hemoglobin değerindeki azalmalar pestisitte yer alan zararlı etki sebebiyle hücrelerin yıkımı ile alakalıdır. Hemoglobin seviyesindeki artışa neden faktör osmoregülasyon dengesinin bozulması, kan akışkanlığı ve hipoksinin azalmasıdır (Jawale ve Dama, 2010). Yaptığımız çalışmada, gökkuşluğu alabalığında uygulanan pestisit dozunun artmasıyla beraber pestisit etkisinde belirlenen hemoglobin düzeyindeki

yükselmenin, eritrosit sayısı veya hemoglobin sentez mekanizmalarının bozulmasıyla ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir (McCarthy ve ark., 1973).

Hematokrit düzeyi, eritrosit sayısı ile orantılı olması sebebiyle kanın oksijen taşıma kapasitesi ve eritropoietik dokuların işlevleri hakkında bilgi veren önemli bir parametredir (Witeska, 2005). Çalışmamızda, hematokrit bakımından yapılan varyans analizi sonucunda, zaman (p<0.01), doz (p<0.05) ve doz x zaman (p<0.01) etkisine ait olasılık değeri önemli bulunmuştur.

Eritrositler, balıkların çoğunda böbrek ve dalakta şekillenerek içerdikleri hemoglobin sayesinde dokulardan solungaçlara CO₂ ve solungaçlardan dokulara O₂ taşımaktadırlar, CO₂

ve O₂ taşınması balık sağlığı bakımından önemlidir (Pala, 2013). Çalışmamızda, zaman ve doz etkilerinin eritrosit üzerinde oldukça önemli bir etki oluşturduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Herbisit uygulaması eritrosit miktarını her iki dozda arttırmıştır. Stres ortamında bulunan balıklarda, fizyolojik sistemin gereği olarak dalak sürekli kasılarak eritrosit üretiminin artışı teşvik edeceğinden eritrosit sayısında artış meydana gelebilir (Parlak, 2016).

Lökosit, vücudu bulaşıcı hastalıklara, enfeksiyonlara karşı korumak için bağışıklık sistemiyle beraber çalışan beyaz kan hücreleridir. Vücuda yabancı madde girdiğinde lökosit sayısında artış görülür. Lökosit sayısındaki artış, kirleticilere maruz kalan balığın hayatta kalabilmesine ve fizyolojik durumun bütünlüğünü koruyabilmesine yardımcı olan antikorların artışıyla paralellik göstermektedir (Ayoola, 2011). Çalışmamızda zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin lökosit düzeyi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Lökosit sayısında meydana gelen artışın toksik maddeye karşı balıkların, savunma mekanizmalarını geliştirdiği ancak doz ve zaman artışına bağlı olarak bağışıklık sistemini zayıflattığı belirtilebilir. Lökosit sayısında görülen ani artış, balıkların bağışıklık mekanizmaları ve savunma sisteminin aktivasyonunun güçlü olmasıyla açıklanabilir (Parlak, 2016). Çalışmamızda lökosit miktarındaki değişimlerin doza bağlı olarak dalgalı bir şekilde devam ettiği görülmüştür. Lökosit sayısındaki artışın nedeni balığın savunma sistemiyle homeostasi dengesi kurmaya çalışmasıdır. Lökosit sayısındaki düşüşün nedeni ise, hematolojik dokularda oluşan bozukluk ya da enfeksiyonların arttığı anlamına gelir.

Trombositler hem damar sistemi hem de kanın bizzat kendisi kan kaybının önlenmesine yönelik bir dizi koruyucu mekanizmaya sahiptir. Sağlıklı balık türlerinde trombosit sayıları 2.000-78.900 μ L arasında değişim göstermektedir. Yaş, sezon, cinsiyet, su sıcaklığı, pH, oksijen gibi faktörler trombosit sayısını değiştirmektedir (Yılmaz, 2011).

Yaptığımız bu çalışmada, zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin trombosit düzeyi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). Vücutta ksebiyotik madde miktarı, kan hücrelerindeki oksijen miktarının azalması, kana bağlı bağışıklık sistemini etkileyen olumsuz durumlar ve dalakta meydana gelen olumsuz faktörler trombosit eksikliğinin nedeni olarak görülebilir. Trombosit sayısını (Lester

and Budd, 1983) salmonlarda 26,103 mm³ (Casillas and Smith, 1977) gökkuşağı alabalıklarında stresten önce 21.103 mm³, stresten sonra ise 43.103/mm³ olarak bulmuşlardır. Balıklarda stres faktörleri; sıcaklık, çeşitli kirleticiler ve oksijen gibi ortamın kimyasal ve fiziksel yapısındaki herhangi bir faktörde oluşan değişimlerin etkileri sonucunda gerçekleşmektedirler (Duran, 2011). Normal koşullarda eritrosit hücre parametreleri fazlaca stabil olup stres koşullarında farklılıklar göstererek kan pozisyonundaki kantitatif farklılaşmaların miktarını sağlayabilir. Balıklar, hipoksi durumunun gerçekleştiği ortamlarda bu durumun üstesinden gelebilmek için eritrositlerin, MCH ve MCV miktarını artırmaktadır. Bu değerlerde oluşan artış eritrositlerin yıkımı nedeniyle ya da üretilmemesinden dolayı meydana gelmektedir. Stres faktörünün MCHC değerinde azalışa, Hct ve MCV değerlerinde ise artışa sebep olduğunu rapor etmişlerdir (Iversen ve ark., 1998).

MCV kırmızı kan hücrelerinin ortalama hacmidir. Kan dolaşımında bulunan alyuvarların boyutları hakkında bilgi verir. Yaptığımız çalışma sonucunda, MCV bakımından zaman, doz ve doz x zaman interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Çalışmamız sonucunda, MCH bakımından sadece zaman ($p<0.01$) ve doz ($p<0.05$) faktörlerinin etkileri önemli bulunmuştur (Ceylan ve Altun, 2011). *Vibrio anguillarum* ile infekte edilen gökkuşağı alabalıklarında MCH değerlerini incelemiş kontrol gruba göre infekte grubun MCH değerlerinin arttığını (Altun ve Diler, 1996) infekte grupta MCH'nin 5. güne kadar azaldığını ve 15. güne kadar arttığını (Alak ve ark, 2012) kadmiyum ve humik asitin MCH'yi 122.17 den 68.67 ve 28.86'ya düşürdüğünü belirtmişlerdir. MCH değerlerinde artış ve azalışların dalgalı bir seyirde ilerlemesi vücutta vitamin ve mineral düzeylerinin eksik olduğunu ifade etmektedir. MCHC kırmızı kan hücresindeki belli miktar hemoglobin yoğunluğu değeridir. Hemoglobin, akciğerden organlara oksijen transfer eden kandaki bir bileşendir. Yaptığımız çalışma sonucunda, MCHC bakımından doz, zaman ve doz x zaman interaksiyonlarının etkileri önemli bulunmuştur ($p<0.01$). 2,4-D herbisit uygulaması sonucunda, kontrol grubuna göre hem Doz-1 hem de Doz-2 gruplarında MCHC değerleri artmıştır.

Çizelge 2. Enzim parametreleri

		CAT	GPx	SOD	MDA
Dozlar	Kontrol	0.18±0.36 ^c	0.19±0.01 ^c	0.15±0.01 ^c	0.12±0.01 ^c
	D1	0.38±1.87 ^b	0.36±0.01 ^b	0.51±0.01 ^b	0.19±0.01 ^b
	D2	0.45±2.67 ^a	0.43±0.01 ^a	0.61±0.01 ^a	0.22±0.01 ^a
Süre (Saat)	0	0,17±0,65 ^d	0,14± 0,01 ^d	0,07± 0,02 ^d	0.10±0.01 ^d
	24	0.24±3.22 ^b	0.27±0.01 ^c	0.40±0.02 ^c	0.15±0.01 ^c
	48	0.34±4.06 ^a	0.41±0.01 ^b	0.54±0.02 ^b	0.19±0.01 ^b
	96	0.36±2.05 ^c	0.49±0.01 ^a	0.67±0.02 ^a	0.26±0.01 ^a

a, b, c↓ aynı uygulama içinde farklı zaman seviye ortalamalarının karşılaştırılması.

Balıkların savunma sistemlerinde enzimler önemli bir rol oynamaktadır (Uçar, 2010). Enzimlerdeki değişiklik strese sebep olurken bu durum balıkların bağışıklık sistemlerinin zayıflamasına ve dirençlerinin düşmesine, normal gelişim gösterememelerine ve üreme kabiliyetlerinin azalmasına sebep olmaktadır. Hücrelerde enerji akışının kontrolünü zorlaştıran stres faktörleri, çeşitli mekanizmalar vasıtasıyla biyomoleküllere zarar vermekte ve bu durum sucul organizmalarda antioksidan savunma sistemlerini etkilemektedir (Akbulut ve ark., 2014).

Antioksidan enzimler oksidatif strese indüklenen ana bileşenler olup, Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Süperoksitdismutaz (SOD), Katalaz (CAT) gibi endojen enzimler ile vitamin C, E ve bazı ilaçlar gibi eksojen enzimlerden oluşmaktadır. Bu enzimler hücredeki dengenin sağlanmasında yaşamsal bir etkiye sahiptirler ve kirleticilere verilen bir tepkinin sonucu olarak indüksiyonları, lipid peroksidasyonları ve antioksidan enzim aktivitelerini toksikolojik çalışmalarda, hücre hasarlarının incelenmesinde önemli bir indikatör olarak kullanırlar (Mişe Yonar ve ark., 2011).

MDA seviyesi dokularda lipid peroksidasyon düzeyindeki değişimi ifade etmektedir. Çalışmamızda varyans analiz sonuçları incelendiğinde, gökkuşağı alabalıklarında MDA bakımından zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin önemli seviyede arttığı belirlenmiştir ($p<0.01$). Katalaz enzimi, hücre içerisinde meydana gelen reaksiyonlar neticesinde yan ürün olarak ortaya çıkan hidrojen peroksiti suya dönüştürme görevini üstlenmiştir. Bu sayede H₂O₂'in hücredeki olumsuz etkisi engellenmektedir (Yonar ve ark., 2016). Çalışmamızda varyans analiz sonuçları incelendiğinde, gökkuşağı alabalıklarında katalaz bakımından zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin önemli olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$). Kontrol grubunda 0.167-0.200 olan katalaz enzim düzeyi Doz-1'de 0.170-0.727 ve Doz-2'de 0.171-0.887 değerlerine yükselmiştir.

Hücredeki reaksiyonlar sonucunda meydana gelen hidrojen peroksidin uzaklaştırılması görevini üstlenip hücre içerisinde lipid peroksidasyonunu engelleyen en önemli enzim olan GPx diğer serbest radikallerin engellenmesinde de yer aldığı için en önemli enzimdir (Cheeseman ve Slater, 1993). Çalışmamızda GPx parametresi bakımından yapılan varyans analizi sonucunda zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). GPx miktarı her iki dozda artmıştır. GPx de görülen artışın GSH'ın, aktive olan GSH sentez mekanizmaları ile yerine konmamasıyla ilişkili olabileceği veya diğer detoksifikasyon mekanizmaları ile alakalı olabileceğini düşündürmektedir.

Superoksit dismutaz (SOD) enzimi, oksijen radikallerinin hidrojen peroksit'e değişimini katalizlemektedir ve daha sonraki basamakta ortaya çıkan hidrojen peroksit, katalaz enzimi ile tepkimeye girerek suya dönüşmektedir (Kırıcı ve ark., 2017). Çalışmamızda, zaman, doz ve doz x zaman interaksiyon etkilerinin SOD parametresi üzerinde oldukça önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. SOD serbest radikallere ilk tepki mekanizması olup, ortaya çıkan artışın 2,4-D uygulamasının neden olduğu süperoksit radikallerini ortamdaki uzaklaştırmak için olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmanın parametreleriyle ilgili olarak elde edilen bulgular yapılan bazı çalışmalarla paralellik göstermektedir (Oruç ve ark., 2004; Peixoto ve ark., 2006).

Sonuç ve Öneriler

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz veri kaynaklarına dayanarak doğal su ortamlarında çeşitli sebeplerle oluşan kirliliğin düzenli olarak izlenmesi, canlılar üzerinde oluşturdukları etkiler belirlenerek bu tür çalışmalarla bir veritabanı oluşturulması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda gerekli önlemlerin alınarak yetiştiricilikte zararlı olan kirleticilerin

etkiledikleri seviyelerin belirlenmesi zorunlu bir hale gelmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarının pestisitlere karşı duyarlı ve kirleticilere verilen tepkilerin tespit edilmesinde yararlı biyomarkırlar olabileceği belirlenmiştir. Gökkuşluğu alabalıklarında 2,4-D'nin kan parametrelerinde etkili olduğu ve değişimlere sebep olduğu, doz ve zaman artışına bağlı olarak enzim aktivitelerinde oransal artışlara sebep olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler; Pestisit toksisitesinin belirlenmesinde hematoloji parametrelerinin etkin olduğunu göstermektedir, bilime katkı sağlayacak biyokimyasal toksikoloji dalında, ekotoksikolojik risk değerlendirme çalışmalarında yararlanılabilecektir. Akuatik canlıların bünyesine toksik maddelerin alınmasından sonra oluşan etki ve tepki mekanizmasını bir bütün olarak ortaya koymaktadır.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

&: Bu çalışma Yüksek Lisans tezinden üretilmiştir

Kaynaklar

- Aebi, H. 1984. Catalase. *Methods in Enzymology* 105:121–126.
- Akbulut, C., Kaymak, G., Esmer, H. E., Yön, N. D. ve Kayhan, F. E. 2014. Balıklarda ağır metal ve pestisitler tarafından indüklenen oksidatif stres mekanizmaları. *Ege J Fish Aqua Sci.* 31(3): 155-160.
- Alak, G., Atamanalp, M., Uçar, A., Arslan, H., Şensurat, T., Parlak, V. ve Kocaman, E.M. 2012. Kahverengi alabalıklarda (*Salmo trutta fario*) kadmiyum toksisitesine karşı humik asit etkisinin hematolojik parametrelerle araştırılması. *Ege J Fish Aqua Sci.* 29(4): 181-185.
- Altun, S. ve Diler, Ö. 1996. Yersinia ruckeri ile infekte edilmiş gökkuşluğu alabalıklarında hematolojik incelemeler. *Tr. J. of Veterinary and Animal Science.* 23. 301-309.
- Arslan, M., Karaytuğ, S. ve Cıçık, B. 2006. "Bakırın *Clarias lazera* (Valenciennes, 1840)'da Doku Glikojen ve Serum Glikoz Düzeyi Üzerine Etkileri", *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 23(1/1): 23-27.
- Arsova-Saradinovska, Z., Eken, A., Matevska, N., Erdem, O., Sayal, A., Savaşer, A., Banev, S., Petrovski, D., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Özgök, Y., Suturkova, L., Dimovski,

- AJ. ve Aydın, A. 2009. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem.* 2009, 42;1228-1235.
- Asaroglu, M. 2009. Ankara İli Sınırları İçindeki Bazı Yüzey Suyu Kaynaklarında Pestisit Kalıntı Düzeylerinin Araştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. İzmir.
- Atamanalp, M. 2000. The effect of sublethal doses of cypermethrin on haematological and biochemical parameters of rainbow trout (*O. mykiss*). A. Ü. Fen Bil. Enst. Doktora Tezi, 95–101.
- Ayoola, S.O. 2011. Acute toxicity and histopathology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings exposed to aqueous and ethanolic extracts of *Euphorbia poissonii* leaves. *New Clues Sci.* 1:55-68.
- Beutler, E. 1975. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. New York: Grune and Straton 342 pp.
- Casillas, E. ve Smith, L.S. 1977. "Effect of Stress on Blood coagulation and haematology in rainbow trout (*S. Gairdneri*)." *J. Fish Biol.*, 10, 481-494.
- Ceylan, M. ve Altun, S. 2011. *Vibrio anguillarum* ile infekte edilmiş gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) hematolojik incelemeler. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* 29(2):35-42.
- Cheeseman, K.H. ve Slater, T.F. 1993. An Introduction to free radical biochemistry. *Br Med. Bull. Jul*; 49 (3):481-93.
- Chen, T. ve Zhang, B. 2016. Measurements of proline and malondialdehyde content and antioxidant enzyme activities in leaves of drought stressed cotton. *Bio-Protocol* 6(17):1–14.
- Çelik, Ç. ve Şaner, E. 2006. Balıkların kan parametreleri üzerine ağır metallerin etkisi. *E.Ü Su Ürünleri Dergisi.* Cilt/Volume 23, Ek/Suppl. (1/1): 49-55.
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M.C., Babutb, M. ve Vaseural, P. 1997. Antioxidant Enzymes, Glutathione and Lipid Peroxidation as Relevant Biomarkers of Experimental or Field Exposure in The Gills and The Digestive Gland of The Freshwater Bivalve *Unio Tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 39: 93-110.
- Duran, S. 2011. Bakır (Cu), Çinko (Zn), Kadmiyum (Cd) ve Karışımlarının *Oreochromis Niloticus*'ta Bazı Hematolojik Parametreler Üzerine Etkileri. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Adana.

- Freyhof, J. ve Brooks, E. 2011. European Red List of Freshwater Fishes. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Greene, D.H.S. ve Selivonchick, D.P. 1990. Effects of dietary vegetable, animal and marine lipids on muscle lipid and hematology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 89, 165-182.
- Iversen, M., Finstad, B. ve Nilssen, K.J. 1998: Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. *Aquaculture*, 168: 387394.
- Jawale, C.S. ve Dama, L.B. 2010. Hematological changes in the fresh water fish, *Cyprinus carpio* exposed to sub-lethal concentration of piscicidal compounds from cestrum species. *National Journal of Life Sciences*. 7(1): 81-84.
- Kirici, M., Turk, C., Caglayan, C. ve Kirici, M. 2017. Toxic effects of copper sulphate pentahydrate on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation of freshwater fish *Capoeta umbla* (Heckel, 1843) tissues. *Applied Ecology and Environmental Research*, 15 (3): 1685-1696.
- Knoph, M.B. ve Thorud, K. 1996. Toxicity of ammonia to atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in seawater-effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematological parameters. *Comp. Biochem. Physiol.*, 113(4): 375–381.
- Korkmaz, C., Ay, Ö., Temel, G. ve Erdem, C. 2020. Doğu Akdeniz Bölgesi'nden Avlanılan Balık Türlerinin Kas Dokularında Bazı Pestisit Kalıntılarının Belirlenmesi. *Mediterranean Fisheries and Aquaculture Research*, 3(1):10-19.
- Lester, R.J.G. ve Budd, J. 1983. Soma Changes in the Blood Cells of diseased *coho salmon* can. *J. Zool.* 57, 1458-1464.
- Liu, C., Fan, Y. Y., Liu, M., Cong, H. T., Cheng, H. M. ve Dresselhaus, M. S. 1999. Hydrogen storage in single walled carbon nanotubes at room temperature. *Science Magazine*, 286 (5442), 1127-1129.
- McCarthy, D. H., Stevenson, D. P. ve Roberts, M. S. 1973. Some blood parameters of the rainbow trout (*Salmo gairdneri richardson*). I. The Kamloops variety. *Journal of Fish Biology*, 5, 1-8.
- Mişe Yonar, S., Sakin, F., Yonar, M.E, Ispir, Ü. ve Kirici, M. 2011. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*). *Fresenius Environmental Bulletin*, 20 (8): 1931-1935.
- Oruc, E.Ö., Sevgiler, Y. ve Uner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 137. 43-51.
- Özdaş, E., Ateş, U., Uyanıkgil, Y., Baka, M., Yavaşoğlu, A., Biçer, S. ve Ergen, G. 2006. Bir herbisit olan 2,4-D (Diklorofenoksiasetik asit)'in sıçanlarda testis dokusu üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi*. 45(3): 169-174.
- Özdemir, C., Öztaş, H. ve Kal, E. 2011. Ekosistem üzerindeki 2,4-D asit herbisit ekotoksikolojik etkilerinin araştırılması. *Dünya Uygulamalı Bilimler Dergisi* 14 (Gıda ve Çevre Özel Sayısı): 126-135. ISSN 1818-4952.
- Pala, A. 2013. Trichlorfon uygulanan pullu sazan (*Cyprinus carpio*)'da asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi ve bazı kan parametrelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Parlak, V. ve Atamanalp, M. 2017. Investigation of chronic effects of alfa-cypermethrin on haemototoxic parameters in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Studies*, 17(3): 259-272.
- Parlak, V. 2016. Gökkuşluğu alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*) akut ve kronik alfa sipermetrin uygulamalarının hematotoksik, hepatotoksik ve nefrotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Erzurum.
- Parlak, V. 2019. Temafosa Maruz Kalan Gökkuşluğu Alabalıklarında (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1972) Hematoloji Parametrelerinin Yanıtları. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(1): 10-15.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos, D. ve Fontainhasfernandes, A. 2006. Toxicological Effects of Oxyfluorfen on Oxidative Stress Enzymes in Tilapia *Oreochromis Niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 85: 91-96.
- Peutz, I.L.J.A., Oorschot, R.W.A., Johnson, G.R., Horney, B.S. ve Boon, H.J. 1996. The lucogram as an indicator of marine-cultured rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum), health in Netherlands. *Aquaculture Research*. 27, 437-445.
- Poljsak, B., Suput, D. ve Milisav, I. 2013. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants, *Oxid. Med. Cell. Longev* 2013;2013: Article ID 956792, 11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/956792>
- Sun, Y., Oberley, L.W. ve Li, Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34:497–500
- Tiryaki, O., Canhilal, R. ve Horuz, S. 2010. "Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri ", *Erciyes*

- Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(2): 154-169, 157.
- Tokmak, A. 2020. Sucul Ortamlarda Simazinin Biyodönüşümünde *Coprinus Plicatilis* Hücrelerinin Kullanımı. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Denizli.
- Uçar, U. 2010. Doğal (karanfil yağı) ve sentetik (2-fenoksietanol) anestezi maddelerinin gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss walbaum*, 1792) ve kahverengi alabalığın (*Salmo trutta fariolinneaus*, 1758) kan biyokimyası ve hematolojik parametreleri ile bazı enzim (g6pd, 6-pgd, gr, katalaz) aktiviteleri üzerine etkileri. Atatürk. Üniv. Fen Bil. Enst. Doktora Tezi, Erzurum.
- Ünsal, M. 1998. Klinik Deneyler , Yöntemler ve Sonuçların Değerlendirilmesi , Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Bodrum Su Ürünler Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yay. No: 11. 10-12.
- Val, A. L., De Menezes, G.C. ve Wood, C. M. 1998. Red blood cell adrenergic responses in amazonian teleost. *Journal of Fish Biology*. 52, 83-93.
- Witeska, M. ve Baka, I. 2002. The effect of long term cadmium exposure on common carp blood. *Fresenius Environm. Bulletin*, 11 (12A), 1059-1065.
- Witeska, M. 2005. Stress in Fish Hematological and Immunological Effects of Heavy Metals. *Electronic Journal of Ichthyology*, 1, 35-41.
- Yılmaz, N. 2011. Herbisit bileşik pendimetalinin olası genotoksik etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- Yonar, M.E., Ispir, U. Mişe Yonar, S. ve Kirici, M. 2016. Effect of copper sulphate on the antioxidant parameters in the rainbow trout fry, *Oncorhynchus mykiss*. *Cellular and Molecular Biology*, 62 (6): 55-58.