

2,4-D (DİKLOROFENOKSİASETİK ASİT)'İN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio* Hamilton, 1822) SOLUNGAÇLARINDA ANTIOKSİDAN ENZİMLER VE LİPİD PEROKSİDASYON SEVİYESİ ÜZERİNE AKUT ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Figen Esin KAYHAN^{1*}, Güllü KAYMAK², Cansu AKBULUT², Nazan Deniz YÖN ERTUĞ²

¹Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Göztepe, 34722, İstanbul.

²Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Serdivan, 54187, Sakarya.

*Corresponding author: e-mail: figenesink@gmail.com

Alınış (Received): 23 Şubat 2017, Kabul (Accepted): 05 Ekim 2017, Erken Görünüm (Online First): 20 Ekim 2017, Basım (Published): 15 Aralık 2017

Özet: Bu çalışmanın amacı; 2,4-D (2,4-Diklorofenoksiasetik asit) herbisitinin, zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) solungaçlarında akut oksidatif strese neden olma potansiyellerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesidir. Kontrol grubu (Grup-K) dışındaki balıklar, 96 saat süreyle 2,4-D herbisitinin subletal dozlarının (0,1ppm, 0,5ppm ve 1ppm) etkisine bırakılmıştır. Solungaç dokusunda lipid peroksidasyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla malondialdehit (MDA), antioksidan sistemlere etkisini belirlemek amacıyla da indirgenmiş glutatyon (GSH), katalaz enzim aktivitesi (CAT) ve total protein (TP) seviyeleri belirlenmiştir. Bu çalışmada 2,4-D'nin subletal dozlarına maruz bırakılan zebra balıklarının solungaçlarında total protein seviyelerinin kontrol grubuna oranla azaldığı gözlenmiştir. MDA seviyeleri kontrol grubuna oranla önemli ölçüde artmıştır. GSH seviyeleri 2,4-D herbisitinin en yüksek dozunda artarken diğer gruplarda azalmıştır. CAT aktivitesinde ise kontrol grubuna oranla önemli bir fark gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit, antioksidan enzimler, solungaç, zebra balığı.

Determination of Acute Effects of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid on Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation Levels in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Gills

Abstract: The aim of this study is to determine the potential of 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) herbicide in causing acute oxidative stress in the gills of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) using spectrophotometric methods. Test animals except the control group (Group-K) were exposed to sublethal doses (0.1ppm, 0.5ppm and 1ppm) of 2,4-D herbicide for 96 hours. Malondialdehyde (MDA) was used to determine lipid peroxidation levels, and reduced glutathione (GSH), catalase enzyme activity (CAT) and total protein (TP) levels were determined to determine their effects on antioxidant systems in gill tissues. In this study, total protein levels in gills of zebrafish exposed to sublethal doses of 2,4-D were observed to be reduced compared to the control group. MDA levels significantly increased compared to the control group. GSH levels increased in the highest dose of 2,4-D herbicide but decreased in other doses. No significant difference was found in CAT activity compared to the control group.

Key words: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, Antioxidant enzymes, gill, zebrafish.

Giriş

Son yıllarda sucul ortamlarına karışan çevresel kirleticilerin sucul organizmalarda oluşturduğu biyolojik hasarların belirlenmesi ve bu kirleticilerin biyolojik mekanizmalarının hüresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılması pek çok araştırmaya konu olmuştur (Adeyemi ve ark. 2015, Husak ve ark. 2016, Oliveira ve ark. 2017). Pestisitler tarımsal alanlarda zararlıların ve yabancı otların yok edilmesinde ve üretimin artırılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), klorlu fenoksi asit grubuna ait bir herbisittir ve yaklaşık elli yıldır dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (WHO 2016). Bu tip

yaygın kullanım sonucunda yağmur suları tarafından sucul ortamlara taşınan tarımsal kimyasallar hedef olmayan bazı sucul organizmalarca bünyelerine alınmaktadır. Tarım ilaçlarından etkilenen balıklar düşmanları tarafından daha kolay avlanırlar çünkü hastalıklara karşı dirençleri düşer. Aynı zamanda diğer balıklarla rekabet yetenekleri, yumurtlama, üreme ve geçici açlık gibi zor şartlara toleransları azalmaktadır. Ayrıca yavru balıklarda canlı kalma minimal şartlara bağlı olduğundan pestisitlerin ortamdaki varlığı, canlı kalma süresinin düşmesine neden olmaktadır (Chinalia ve ark. 2007). 2,4-D asit formu, suda oldukça kalıcı

olduğundan canlı dokularda kolayca birikir. Bunun sonucu olarak özellikle besin zinciri yolu ile 2,4-D'nin biyoakümülyasyonu sucul türlerde üreme, yaşama oranı ve büyüme standartlarında düşüşlere ve bazen de tamamen durmasına sebep olabilir (Oliveira ve ark. 2017). Herbisitler sucul ortamlarda besin zinciri içerisinde sırasıyla planktonlar, algler, omurgasızlar, bitkiler ve balıklar tarafından biriktirilir. Bunun sonucu olarak besin zincirinde herhangi bir herbisitinin derişimi zamanla artma eğilimindedir (WHO 2016, FAO 2016).

Oksidatif stres, reaktif oksijen ürünlerinin oluşumu ve antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik sonucu oluşan metabolik süreçteki aksamalarıdır (Ling ve ark. 2017, Persch ve ark. 2017). Hücrelerde meydana gelen tüm metabolik aktivitelerde oluşabilen reaktif oksijen ürünleri oldukça reaktif olup, çevrelerindeki atom ve moleküllere saldırırlar. Çok kısa ömürlü olmalarına rağmen, radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girip ve bir dizi reaksiyon başlatıp onları da radikal moleküllere dönüştürüp oldukça zararlı durumlar oluşturabilirler (Sarıkaya ve Yılmaz 2003, Vigario ve Saboia-Morais 2014). Reaktif oksijen ürünleri, metabolizmada oksidasyon ve redüksiyon sırasında veya çevresel kaynaklı olarak (toksikantlar, ağır metal ve pestisitlerin kalıntıları, iyonize veya ultraviyole radyasyon vs.) sürekli oluşabilirler. Tüm canlılarda olduğu gibi balıklarda da reaktif oksijen ürünleri doku ve organlarda çeşitli fonksiyonel aksaklıklara neden olmakta ve bazı durumlarda ölümler meydana getirmektedir (Özmen ve ark. 2004, Piancini ve ark. 2015). Reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bu moleküller, serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek radikal hasarını önlerler. En önemli antioksidanlar; süperoksit anyonunu H_2O_2 'ye dönüştüren süperoksit dismutaz (SOD), organik peroksitleri detoksifiye eden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve H_2O_2 'yi suya indirgeyen katalaz (CAT) ve indirgenmiş glutatyondur. Çevresel kirlenmeler aynı zamanda reaktif oksijen ürünlerinin oluşumunu arttırarak ya da hücrenin peroksidasyon reaksiyonlarına karşı savunma kapasitesini azaltarak lipid peroksidasyonunu da arttırabilir (Ge ve ark. 2017). Bu çalışmanın amacı; 2,4-D herbisitinin, zebra balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) solungaçlarında oksidatif strese neden olma potansiyellerini spektrofotometrik yöntemlerle incelemektir.

Materyal ve Metot

Zebra balığı, ekotoksikolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir model organizmadır (Simonetti ve ark. 2015, Ling ve ark. 2017). Araştırmamızda kullanılan 2,4-D herbisiti (MERCK-KGaA, Almanya) ticari firmalardan elde edilmiştir. Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarak bitki gelişimini engeller (Özdaş ve ark. 2006). 2,4-D'nin balıklara uygulanacak subletal dozları 2,4 Diklorofenoksi asetik

asit dimetil tuzu emülsiyonu kullanılarak hazırlanmıştır. Deney materyali olarak seçilen zebra balıkları 2-3 yaş aralığında olup, genetik yapılarının uygunluğu açısından insan sağlığı araştırmalarında da dünyada yaygın olarak kullanılan bir "omurgalı model organizma" olması nedeniyle tercih edilmiştir. Zebra balıkları ticari akvaryumculardan satın alınmış ve 10 litrelik cam akvaryumlarda uygun sıcaklık aralığında (24-28°C), uygun havalandırma ve aydınlık/karanlık (14:10) şartlarında tutulmuştur. Akvaryumlar her biri 10 balık içeren 4 gruba ayrılmıştır. Biri kontrol grubu (Grup-K) olmak üzere diğeri 0,1ppm (Grup-I), 0,5ppm (Grup-II) ve 1ppm'lik (Grup-III) deney grupları oluşturulmuştur. 96 saat süren farklı dozlarda pestisit uygulaması için ayrı ayrı akvaryumlar kullanılmıştır. Uygulama sonucunda balıklar -20°C'de soğuk şokuyla bayıltılarak, pens ve bistüri yardımıyla solungaç dokuları disekte edildikten sonra analizlerin yapılacağı zamana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilmiştir. Deney sonrası ölü balıklar Kadıköy Belediyesine ait tıbbi atık ekipleri tarafından alınarak uygun koşullarda imha edilmişlerdir. Daha sonra solungaç doku örneklerinden %10 gramlık doku homojenatı, serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile hazırlanmıştır.

Malondialdehit (MDA) Tayini

MDA tayini, Ledwozyw (1986) yöntemine göre belirlenmiştir. 250µL doku homojenatı, 1,250µL Triklor asetik asit (TCAA) çözeltisi (1,22M, 0,6M HCl'deki) ile karıştırılmıştır. 15 dakika sonra 750µL Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (0,047M) ile 30 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilmiştir. Daha sonra 2,000µL ticari n-Butanol ilave edilen karışım 10 dakika 1,560g'de santrifüj edilmiştir. Butanol fazı alınarak 532nm'de absorbanlar kaydedilmiş ve nmolMDA/gprotein olarak hesaplanmıştır (Ledwozyw ve ark. 1986).

İndirgenmiş Glutatyon (GSH) Tayini

GSH tayini için Beutler (1975) yöntemi kullanılmıştır. 0,2mL homojenat üzerine 0,3mL metafosforik asit, NaCl ve EDTA-Na içeren proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilmiştir. 2,028g'de 10 dakika santrifüj edilen homojenattan 0,2mL süpernatant alınmış ve 0,8mL Na_2HPO_4 çözeltisi (0,3M) ve 0,1mL % 40mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) ile karıştırılmıştır. DTNB ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürünün 412nm'deki ışık absorpsiyonu spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve nmolGSH/gprotein cinsinden değerlendirilmiştir (Beutler 1975).

Katalaz Aktivitesi (CAT) Tayini

CAT tayini Aebi (1974) yöntemi ile yapılmıştır. Katalaz enzimi; H_2O_2 'nin, H_2O 'ya dönüşüm reaksiyonunu katalizler. Bu dönüşüm 240nm'de absorbanın azalması ile takip edilebilir. Deney sırasında 0,4mL doku homojenatı üzerine her bir numune için 0,2mL H_2O_2 çözeltisi (30mM) + fosfat tamponu eklenmiş ve U/mg protein cinsinden hesaplanmıştır (Aebi 1974).

Total Protein (TP) Miktarı Tayini

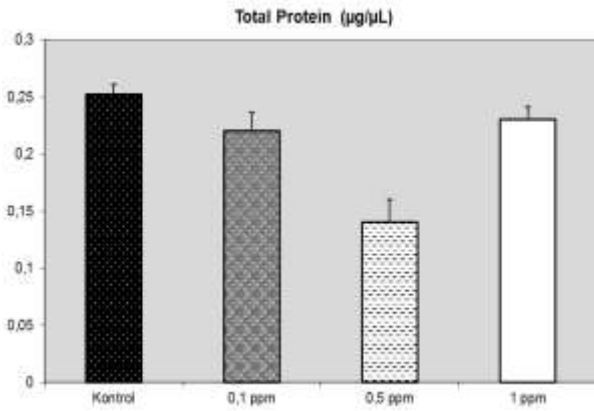
Solungaç dokusunda protein miktarı Bradford (1976) yöntemi ile ölçülmüştür. Stok albümin çözeltisi ile standart eğri grafiği oluşturulmuştur. 25µL doku homojenatı 775µL distile su ve 200µL ticari Bradford reaktifi ile karıştırıldıktan 15 dakika sonra 595nm'de köre karşı absorbansları kaydedilmiştir. Protein miktarları µg/µl cinsinden ifade edilmiştir (Bradford 1976).

İstatistiksel Analizler

Biyokimyasal analiz sonuçları SPSS 16.0 paket programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve student t-testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arası farkların istatistiki önemliliği $p < 0,05$ önem derecesinde belirlenmiştir.

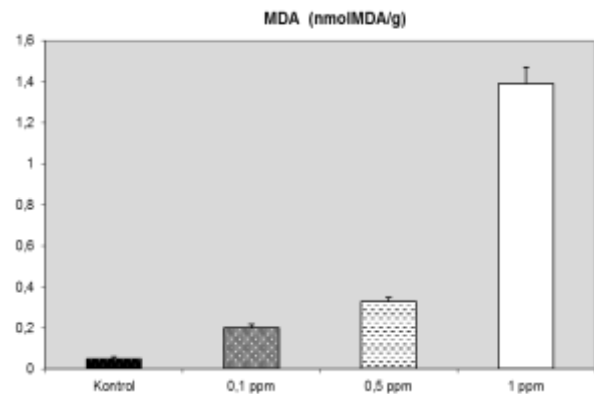
Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada, 2,4-D'nin subletal dozlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan zebra balığı solungaçlarında total protein miktarlarının, kontrol grubuna oranla azaldığı gözlenmiştir. Özellikle Grup-II'de (0,5ppm) önemli oranda azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 1).



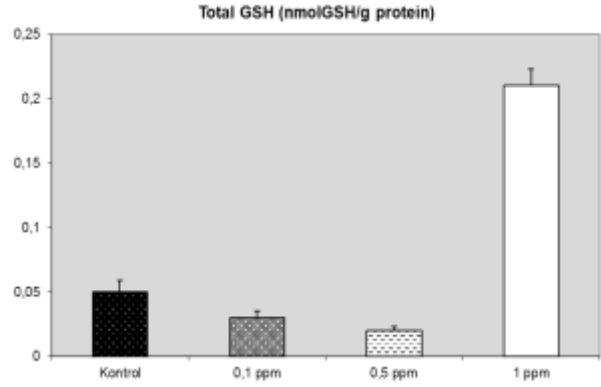
Şekil 1. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında total protein miktarları.

Bu çalışmada zebra balığı solungaçlarında MDA miktarlarının, kontrol grubuna oranla arttığı gözlenmiştir. Özellikle Grup-III'de (1ppm) artışın yüksek oranlarda olduğu ($p < 0,01$) belirlenmiştir (Şekil 2).



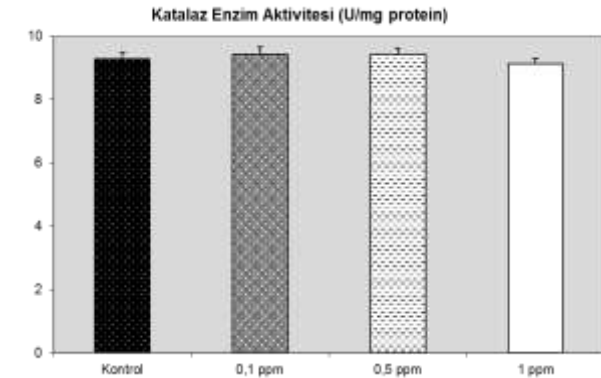
Şekil 2. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaç dokusunda MDA miktarları.

Glutasyon (GSH), oksijen radikali yakalayıcısı olarak antioksidant savunmada önemlidir. GSH düzeyindeki değişim, canlının detoksifikasyon yeteneğinin önemli bir indikatörüdür. Bu çalışmada, Grup III'te GSH seviyelerinde önemli derecede artış ($p < 0,001$) gözlenirken diğer gruplarda kontrole oranla azalma ($p < 0,05$) gözlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında GSH seviyesi.

Bu çalışmada, 2,4-D'nin subletal dozlarının zebra balığı solungaç dokularında 96 saatlik maruziyet sonucunda katalaz aktivitesini fazla etkilemediği, hemen hemen tüm gruplarda aynı seviyede kaldığı gözlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 2,4-D'nin farklı subletal dozlarının etkisinde zebra balığı solungaçlarında katalaz enzim aktivitesi.

Balıklarda solungaçlar çevre kirliliğinden ilk etkilenen organlardır. Solungaçların geniş yüzey alanları toksik maddelerin geçişini kolaylaştırmaktadır. Sucul ortamdaki herbisit kalıntılarının hücre membranında birikmesi sonucu lipid yapısı bozulur. Protein ve lipid arasındaki hidrofobik etkileşimin bozulmasına bağlı olarak enzim aktiviteleri değişebilir (Fernandes ve ark. 2013). Pestisitlerin, balıklarda ve memelilerde antioksidant enzimleri ve lipid peroksidasyonunu olumsuz etkileyerek oksidatif strese neden oldukları bilinmektedir (Piancini ve ark. 2015, Golombieski ve ark. 2016).

Husak ve arkadaşları (2016) *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) türü balıklarla yaptıkları çalışmalarında,

96 saat süreyle Sencor herbisitinin (Metribuzin 4-amino-6-(1,1-dimethylethyl)-3-(methylthio) farklı konsantrasyonlarını uygulayarak solungaç dokusundaki bazı enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Deneyle sonuçunda solungaç dokuda SOD ve GSH aktivitelerinde artış gözlemlenmiştir (Husak ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda 2,4-D'nin farklı dozları Grup-I (0,1ppm) ve Grup-II (0,5ppm) ve Grup-III (1ppm) olacak şekilde sıralanmıştır. Grup II'de solungaç dokularının protein seviyelerinde önemli ölçüde azalma gözlenmiştir. Grup-I ve Grup-III'de protein miktarında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlenmiştir. Genel olarak sucul canlılarda izlenen adaptasyon süreçlerinde, canlıların çevresel kirleticilere verdikleri fizyolojik yanıtlar biyokimyasal yollarla izlenebilir (Tabassum ve ark. 2016, Golombieski ve ark. 2016). Buna göre, Grup-I balıklarında düşük protein tespit edilmesi henüz kirleticiye karşı bir tepkinin oluşmadığı şeklinde yorumlanabilir. Grup-II balıklarının protein seviyelerinde görülen azalmanın ise balığın adaptasyon süreci içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Grup-III balıklarında düşük protein seviyesinin tespit edilmesi ise balıkların kirleticiye karşı adaptasyon sürecine girdiğini göstermektedir.

Persch ve arkadaşları (2017) kimyasal stres altında antioksidan sistemlerin indüklenmesinin adaptasyon olarak değerlendirilebileceğini, adaptasyonun olmaması halinde ise organizmanın toksik maddeye duyarlı olacağını ve toksisitenin başlayacağını belirtmişlerdir (Persch ve ark. 2017). *Channa punctata* (Bloch, 1793) türü balıklarla yapılan bir araştırmada araştırmacılar 96 saat süreyle balıklara Pendimethalin herbisitinin 0,5 ve 0,8ppb dozlarını uygulamışlardır. Pendimethalin uygulamasının lipid peroksidasyonu ve protein oksidasyon sürecini tüm dokularda arttırdığını rapor etmişlerdir. Ayrıca, doza bağlı olarak GSH ve CAT enzim aktivitelerini indirgediği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda aksine MDA ve GSH seviyeleri 1ppm doz uygulanan grupta, kontrol grubuna oranla önemli miktarda artmıştır. Gluszczak ve arkadaşları tarafından 2007 yılında yapılan bir çalışmada, *Rhamdia quelen* (Quoy ve Gaimard, 1824) türü balıkların Glifosat'ın 0,2 ve 0,4ppm dozlarına 96 saat süreyle maruz bırakılması sonucunda, balıkların karaciğer dokularında protein seviyelerinin arttığı, kas dokularında ise azaldığı bildirilmiştir (Gluszczak ve ark. 2007). Genellikle GDO'lu soya ve mısır üretiminde kullanılan ve Roundup ticari adıyla satılan glifosat, havada, suda ve yiyeceklerin yanı sıra ilaca maruz kalan tarım işçilerinin kan ve idrarlarında da tespit edildiği rapor edilmiştir (WHO 2016). Araştırmacılar, protein seviyelerindeki bu artışın oksidatif strese karşı biyokimyasal adaptasyon geliştirmesi sonucu olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada ise, protein seviyelerinde görülen azalmanın nedeni, serbest radikallerin proteinlerin tiyol gruplarına bağlanması ve protein yapısında farklı konfigürasyonlar geliştirmesi olabilir. Yapılan bir çalışmada bir herbisit olan Paraquat'ın 1ppm'lik dozuna 24 saat maruz bırakılan *C. punctata* (Yeşil Yılanbaşı balığı) türü balıkların tüm

dokularında protein seviyelerinde bizim bulgularımızın tersine artış belirlenmiştir (Parvez ve Raisuddin 2006). Bizim çalışmamızda total protein miktarının genellikle kontrol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Özellikle Grup-2'de (0,5ppm) daha da düşük olduğu görülmektedir (Şekil 1).

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden biridir ve oksidatif hasarın belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir parametredir. Yani MDA miktarının yüksek bulunması, lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Bizim çalışmamızda tüm gruplarda MDA miktarları kontrol grubuna oranla yüksek bulunmuştur (Şekil 2). Lipid peroksidasyonu hücresel membranlarda pestisitlerin neden olduğu hasarının ilk göstergesidir (Koç ve Akbulut 2012). Artan lipid peroksidasyonu koruyucu antioksidan enzimlerin aktivitelerini etkiler. Lipid peroksidasyonunun düşük düzeylerde olması veya hiç oluşmaması oksidatif enzimlerin koruyucu etkilerinin var olduğunun göstergesidir. Persch ve ark. (2017) bir herbisit olan Clomazo'nun, *R. quelen* (Gümüş Yayınbalığı) türü balıkların karaciğer, beyin ve kas dokularında oksidatif stres şartlarında MDA seviyelerini arttırdığını belirtmişlerdir (Persch ve ark. 2017). Xing ve ark. (2012) atrazin ve klorprifos pestisitlerinin ayrı ayrı ve birlikte *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) karaciğer ve solungaç dokuları üzerine akut etkilerini inceledikleri araştırmalarında, reaktif oksijen ürünlerinin hücre zarı lipidlerinde hasara ve MDA seviyelerinde artışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (Xing ve ark. 2012).

GSH seviyesi, hücresel işlevlerin korunmasında önemlidir. GSH seviyesi detoksifikasyon ve oksidatif stres durumlarında azalabilmektedir. Ancak devam eden stres durumunda GSH/GSSG oranı adaptif mekanizmaların etkisi ile oksidatif strese karşı koyabilmek üzere artışa geçebilir. Bu nedenle de GSH çevresel kirliliğin etkilerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (Zhang ve ark. 2005, Husak ve ark. 2016). Bu çalışmada, Grup-III'de GSH seviyelerinde önemli derecede artış gözlenirken diğer gruplarda kontrol grubuna oranla azalma belirlenmiştir (Şekil 3). Sucul türlerle yapılan bazı çalışmalarda pestisitlere maruziyet sonucu dokularda GSH seviyelerinde genellikle azalma gözlenmiştir (Li ve ark. 2003, Monteiro ve ark. 2006, Piancini ve ark. 2015, Tabassum ve ark. 2016). Bunun sebebi, GSH'nin devam eden stres durumunda ya da pestisite maruziyetin yüksek dozlarda olması durumunda, adaptif mekanizmaların devreye girmesi şeklinde açıklanabilir. Çünkü GSH seviyeleri oksidatif stres durumunda önce azalmakta, daha sonra artabilmektedir. Stara ve arkadaşları *C. carpio*'da bir herbisit olan Simazin'in (2-chloro-4,6-bis-(ethylamino)-s-triazine) kronik maruziyette tüm dokularda indirgenmiş glutatyon miktarını 14. ve 28. günlerde artırdığını ancak, 60. günde azalttığını rapor etmişlerdir (Stara ve ark. 2012).

Antioksidan enzimler hücre içi dengelerin düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahiptirler ve indüksiyonları pestisitler gibi kirleticilere karşı verilen

tepkinin bir sonucudur. CAT, savunma mekanizmasında yer alan önemli hücre içi antioksidan enzimlerdendir ve oluşan H₂O₂'i substrat olarak kullanarak oksijen ve suya parçalamak suretiyle H₂O₂'nin detoksifikasyonunu sağlayan peroksidazlardır (Karasu Benli ve ark. 2012, Adeyemi ve ark. 2015, Tabassum ve ark. 2016). Aşırı oksijen radikali üretimi CAT aktivitesini inhibe edebilme özelliğine sahiptir (Persch ve ark. 2017). Oruç ve arkadaşları (2004), Azinfosmetil, 2,4-D ve bu iki pestisit kombinasyonlarının *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Tilapya balığı) ve *C. carpio*'nun (Sazan balığı) solungaç, böbrek ve beyin dokularında antioksidan sistemleri incelemiştir. Araştırmacılar, *O. niloticus*'un beyin dokusunda CAT aktivitesinin değişmediğini, *C. carpio*'da ise bu pestisitlerin tek başına ve kombine uygulamalarında, böbrekte CAT aktivitesinin yükseldiğini belirtmişlerdir (Oruç ve ark. 2004). Katalaz seviyelerindeki artışların gösterildiği bazı çalışmaların tersine pestisitlerin toksik etkisi üzerine yapılan birçok çalışmada CAT aktivitesinin azaldığı da bildirilmiştir (Zhang 2005, Vasyukiv ve ark. 2011, Xing ve ark. 2012, Husak ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda CAT aktivitesindeki değişikliğin istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4). CAT, SOD ve GST gibi, balıkların antioksidan sistemlerinde de görülen temel enzim gruplarının serbest radikalleri yok edici etkilerinin olduğu bilinmektedir. Bu enzim grupları sucul ortamlarda bulunan çeşitli pestisitlerin neden olduğu zararlı etkilere

karşı, balıkların solungaç hücrelerini korumakla görevlidirler.

Parçalanma süreleri uzun olan herbisitlerin yaygın ve kontrolsüz kullanımının sucul canlılar için önemli problemler yaratacağı öngörülmektedir. Çalışmamızdan elde edilen bulgular, genel veriler ile paralellik göstermektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler tarım alanlarında kullanılan kimyasalların sucul canlılara zarar verdiğini veya zarar verme potansiyellerinin yüksek olduğunu göstermektedir. Toksik maddeler gıda zincirinin bütün basamaklarındaki canlı gruplarını etkilemektedir. Bu nedenle, sucul kirlilik değerlendirme araştırmaları farklı sucul canlı grupları üzerinde periyodik olarak izlenmelidir. Çevre sağlığı açısından herbisitlerin yoğun olarak kullanıldığı tarımsal alanlarda toksik araştırmalar yapılmasının yanı sıra sucul alanlarda da kirlenici maddelerin derişimleri sürekli izlenmelidir. Pestisit kullanımını yasaklamak veya tamamen piyasadan kaldırmak bugünkü şartlar altında mümkün değildir. Ancak bazı tedbirler almak suretiyle pestisitlerin toprak ve su kirliliği ile çevre sağlığı açısından yarattığı sorunları en aza indirmek mümkündür. Sonuç olarak, bu çalışma, 2,4-D herbisitinin, balıkların solungaç dokuları üzerine zararlı akut etkileri olduğunu göstermiştir. Balıklardaki söz konusu biyokimyasal parametrelerin, çevresel kirlilik çalışmaları ve ekotoksikolojik risk belirlemelerinde uygun ve güvenli indikatörler olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Adeyemi, J.A., Martins-Junior, A.C. & Barbosa, J.F. 2015. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 7(12): 172-173.
2. Aebi, H. 1974. Catalase invitro. In: Methods of enzymatic analysis, Ed: Bergmeyer HU, 2nd ed, FL pp:121-126.
3. Beutler, E. 1975. *Glutathione in red cell metabolism: A manual of biochemical methods*. pp: 112-114, 2nd ed., Grune and Stratton, New York.
4. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
5. Chinalia, F.A., Regali-Seleguin, M.H. & Correa, E.M. 2007. 2,4-D Toxicity: Cause, Effect and Control. Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology. Invited Review. *Global Science Books*. p: 24-33.
6. Fernandes, M.N., Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Ramos, C.A. & Pereira, C.D. 2013. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: An integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. *Aquatic Toxicology*, 126: 180-190.
7. Food and Agriculture Organization (FAO), 2016. <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr-rep/en/> (Erişim: Mart 2017).
8. Ge, T., Han, J., Qi, Y., Gu, X., Ma, L., Zhang, C., Naeem, S. & Huang, D. 2017. The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicology*, 184: 78-93.
9. Gluszcak, L., Dos Santos Miron, D., Moraes, B.S., Simoes, R.R. & Schetinger, M.R. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146: 519-524.
10. Golombieski, J.I., Sutilli, F.J., Salbego, J., Seben, D., Gressler, L.T., Arruda da Cunha, J., Gressler, L.T., Zanella, R., Vaucher, R.A., Marchesan, E. & Baldisserotto, B. 2016. Imazapyr+imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 128: 91-99.
11. Husak, V.V., Mosiichuk, N.M., Maksymiv, I.V., Storey, J.M., Storey, K.B. & Lushchak, V.I. 2016. Oxidative stress responses in gills of goldfish, *Carassius auratus*, exposed to the metribuzin-containing herbicide Sencor. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45: 163-169.
12. Karasu Benli, A.C., Şahin, D., Koçak Memmi, B. & Sepici Dinçel, A. 2012. Karbaril'e maruz kalan tatlı su istakozlarında (*Astacus leptodactylus* Eschscholtz, 1823) antioksidan enzim düzeyleri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 37(2): 162-166.
13. Koç, N.D. & Akbulut, C. 2012. Histological analysis of acute toxicity of 2,4-diclorophenoxyacetic acid in ovary of zebrafish, *Animal Cells and Systems*, 16: 400-407.

14. Ledwozyw, A., Michalak, D., Stepień, A. & Kadziolka, A. 1986. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 155(3): 275-283.
15. Li, W., Yin, D., Zhou, Y. & Wang, L. 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of Crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 251-255.
16. Ling, L., Chia-W.L., Yung C., Lai, P.L. & Hsu T. 2017. Oxidative stress intensity-related effects of cadmium and paraquat (PQ) on UV-damaged-DNA binding and excision repair activities in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere*, 167: 10-18.
17. Monteiro, D.A., De Almeida, J.A., Rantin, F.T. & Kalinin, A.L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish *Brycon cephalus* exposed to organophosphorus insecticide folisuper 600 (Methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 141-149.
18. Oliveira, J.M.M., Galhano, V., Henriques, I., Soares, A.M.V.M. & Loureiro, S. 2017. Basagran® induces developmental malformations and changes the bacterial community of zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, 221: 52-63.
19. Oruç, E.Ö., Sevgiler, Y. & Üner, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137: 43-51.
20. Özdaş, E., Ateş, U., Uyanıkgil, Y., Baka, M., Yavaşoğlu, A., Biçer, S., Ergen, G. 2006. Bir herbisit olan 2,4-D'nin sığanlarda testis dokusu üzerine etkisi. *Ege Tıp Dergisi*, 45(3): 169-174.
21. Özmen, I.A.M., Cengiz, M., Sirkecioğlu, N. & Atamanalp, M. 2004. Effect of water reduce system on antioxidant enzymes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W., 1792). *Veterinarni Medicina Czech*, 49(10): 373-378.
22. Parvez, S. & Raisuddin, S. 2006. Effects of paraquat on the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch): Non-enzymatic antioxidants as biomarkers of exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 392-397.
23. Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S. & Oliveira, G.T. 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere*, 174: 98-109.
24. Piancini, L.D.S., Guiloski, I.C., Silva de Assis, H.C. & Cestari, M.M. 2015. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. *Toxicology Reports*, 2: 1157-1163.
25. Sarıkaya, R. & Yılmaz, M. 2003. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D herbicide on the behaviour of the common carp (*C. carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*, 52: 195-201.
26. Simonetti, R.B., Marques, L.S., Streit, D.P. & Oberst, E.R. 2015. Zebrafish (*Danio rerio*): The future of animal model in biomedical research. *Journal of Fisheries Sciences*. 9(3): 039-045.
27. Stara, A., Machova, J. & Velisek, J. 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33: 334-343.
28. Tabassum, H., Ashafaq, M., Khan, J., Shah, Z., Raisuddin, S. & Parvez, S. 2016. Short term exposure of pendimethalin induces biochemical and histological perturbations in liver, kidney and gill of freshwater fish. *Ecological Indicators*, 63: 29-36.
29. Vasylykiv, O.Y., Kubrak, O.I., Storey, K.B. & Lushchak, V.I. 2011. Catalase activity as a potential vital biomarker of fish intoxication by the herbicide aminotriazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 101: 1-5.
30. Vigario, A.F., & Saboia-Morais, S.M.T. 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 34(6): 523-528.
31. World Health Organization (WHO). 2016. http://www.who.int/foodsafety/areas_work/chemical-risks/jmpr/en/ (Erişim: Mart 2017).
32. Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S. & Wang, X. 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103: 74-80.
33. Zhang, J.F., Liu, H., Sun, Y.Y., Wang, X.R., Wu, J.C. & Xue, Y.Q. 2005. Responses of the antioxidant defenses of the goldfish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-Dichlorophenol. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19: 185-190.