



Diklofenak Sodyumun Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvaları Üzerindeki Teratojenik ve Gelişimsel Toksisitesinin Değerlendirilmesi

Duygu Özhan TURHAN

Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Inonu University, Malatya 44280, Türkiye
https://orcid.org/0000-0002-7111-4289
duygu.turhan@inonu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada tıpta ve veteriner hekimlikte ağrı ve iltihabı kontrol etmek için kullanılan diklofenak sodyumun (DKFS) zebra balığı embriyoları ve larvaları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Embriyolar 96 saat süreyle 0.21-5.33 mg L⁻¹ DKFS'ye maruz bırakılmış ve bu bireylerin hayatta kalma oranları, kalp atım sayıları, kuluçkadan çıkma oranları ve vücut malformasyonları belirlenmiştir. LC₅₀, EC₅₀ ve teratojenik indeks (TI) değerleri sırasıyla 1.55 ve 0.81, 1.91 olarak hesaplanmıştır. DKFS, hesaplanan TI değerine göre zebra balığı embriyoları için teratojendir. 0.47 mg L⁻¹ ve daha yüksek konsantrasyonlarda DKFS zebra balıklarında, perikardiyal ödem, yolk kesesi ödemi, kuyruk malformasyonu ve omurga eğriliğine neden olmuştur. En sık rastlanan malformasyonlar perikardiyal ve yolk kesesi ödemi olarak belirlenmiştir. 0.7 mg L⁻¹ ve daha yüksek konsantrasyonlarda zebra balıkları larvalarının boy uzunluklarında ve dakikadaki kalp atım sayılarında önemli oranda inhibisyona neden olmuştur. 2.37 mg L⁻¹ ve daha yüksek konsantrasyonlarda DKFS'nin ise zebra balıklarının kuluçkadan çıkma oranlarını %50'nin altına düşürdüğünü göstermiştir. Bu sonuçlar, DKFS'nin zebra balığı gelişimi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğunu ve sucül ortama girmesi durumunda su ekosistemini olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir.

Su Ürünleri

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 26.11.2021

Kabul Tarihi : 01.01.2023

Anahtar Kelimeler

Diklofenak sodyum
Zebra balığı embriyo testi
Toksisite

Evaluation of Teratogenic and Developmental Toxicity of Diclofenac Sodium on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae

ABSTRACT

In this study, the effects of diclofenac sodium (DKFS), used in medicine and veterinary medicine to control pain and inflammation, on zebrafish embryos and larvae were evaluated. Embryos were exposed to 0.21-5.33 mg L⁻¹ DCFS for 96 hours and the survival rates, heart rate, hatching rates and body malformations of these individuals were determined. LC₅₀, EC₅₀ and teratogenic index (TI) values were calculated as 1.55 and 0.81, 1.91, respectively. DKFS is teratogenic for zebrafish embryos based on the calculated TI value. DKFS at concentrations of 0.47 mg L⁻¹ and higher caused pericardial edema, yolk sac edema, tail malformation and spinal curvature in zebrafish. The most common malformations were determined as pericardial and yolk sac edema. At concentrations of 0.7 mg L⁻¹ and higher, it caused significant inhibition in the length and heart rate of zebrafish larvae. It has been shown that DKFS at concentrations of 2.37 mg L⁻¹ and higher reduced the hatching rate of zebrafish below 50%. These results show that DKFS causes adverse effects on zebrafish development and may adversely affect the aquatic ecosystem if it enters the aquatic environment.

Fisheries

Research Article

Article History

Received : 26.11.2021

Accepted : 01.01.2022

Keywords

Diclofenac sodium
Zebrafish embryo test
Toxicity

Atıf Şekli: Turhan DÖ (2023). Diklofenak Sodyumun Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvaları Üzerindeki Teratojenik ve Gelişimsel Toksisitesinin Değerlendirilmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 26(1), 183-191. https:// DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.1028753

To Cite : Turhan DÖ (2023). Evaluation of Teratogenic and Developmental Toxicity of Diclofenac Sodium on Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *KSU J. Agric Nat* *KSU J. Agric Nat* 26(1), 183-191. https:// DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.1028753

GİRİŞ

Farmasötikler, sucul ekosistemde yaygın olarak bulunan ksenobiyotik bileşiklerdir. Bu bileşiklerden kaynaklanan çevre kirliliği, sucul organizmalar ve insan sağlığı için potansiyel riskler oluşturabilmektedir (Daou ve ark., 2020). Bu bileşikler ve metabolitleri, evsel, endüstriyel ve hastane atıkları ile su kütlelerine ve besin zinciri yolu ile insana kadar ulaşabilmektedir (Santos ve ark., 2021).

Diklofenak sodyum (DKFS), ağrı ve iltihabı kontrol etmek için kullanılan, steroid olmayan anti-inflamatuar bir ilaçtır. Fenilasetik asidin bir türevidir (sodyum 2-(2-(2,6-diklorofenilamino) fenil) asetik asit), 1970 yılından beri tıpta genellikle sodyum veya potasyum tuzu olarak kullanılmaktadır. Dünya genelinde çok yaygın olarak kullanıldığından dolayı çoğu sucul ekosistemde sıklıkla tespit edilmektedir (Mirzaee ve ark., 2021).

DKFS, yüzey sularında $0.0002 - 100 \mu\text{g L}^{-1}$ konsantrasyon aralığında bulunabilmektedir. Sucul ekosistemde bulunan DKFS'ye kronik maruziyet, hedef olmayan sucul organizmaların metabolizması üzerine toksik etkilere neden olabilmektedir. Çünkü bu ilaçların, birçok hayvan türünde bulunan ve prostanooidlerin sentezinden sorumlu enzim olan siklooksijenaz aktivitesini ve DNA sentezini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Felice ve ark., 2012). Ayrıca, anti-inflamatuar ilaç diklofenak Avrupa Komisyonu, 20 Mart 2015 tarih ve 2015/495 sayılı Uygulama Kararı, 2008/105/EC ve 2000/60/EC Su Çerçeve Direktifi kapsamında, öncelikli maddelerin "izleme listesine" dahil edilmiştir (Koba ve ark. 2018).

Zebra balığı, çeşitli kimyasalların ve kirlleticilerin gelişimsel toksisite değerlendirmesinde ve teratojenite taramasında yaygın olarak kullanılan model organizmalardan biridir. Geleneksel hayvan modelleriyle karşılaştırıldığında, şeffaflık, küçük boyut, az miktarda test bileşiği gerekliliği, düşük maliyet, kolay bakım ve insan organ sistemlerine büyük benzerlik gibi birçok avantaja sahiptir (Jia ve ark., 2020; Nguyen ve ark., 2021).

Bu çalışmada, DKFS'nin zebra balıklarında kullanılan maruz kalma konsantrasyonları, yüzey sularında ölçülen değerlere nispeten yakın veya daha yüksek seviyelerdedir. Bunun nedeni, hem DKFS'nin sucul ortamda letal konsantrasyonlarını ve subletal etkilerini belirlemek hem de DKFS'nin çevresel sularda konsantrasyonunun artması durumunda ne tür etkilere neden olabileceğini göstermektir. Bu amaçla, balık embriyo testi kullanılarak DKFS'nin zebra balıkları juvenillerinde hayatta kalma, büyüme ve gelişme, kalp atım oranı, kuluçkadan çıkma oranı ve teratojenite durumu gibi farklı biyolojik yanıtlar belirlenmiştir. Böylece, DKFS'nin zebra balıkları

embriyolarında neden olduğu letalite düzeylerinin yanı sıra teratojenitesi ile ilgili sınırlı veriye katkı sunulmuştur.

MATERYAL ve METOD

Test organizması

Çalışmada kullanılan embriyolar, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Sucul Omurgalı Deney Hayvanları Birimi, Zebra Balığı Ünitesinde bulunan zebra balığı üretim sisteminde (ZebTec Active Blue, Tecniplast, İtalya) yetiştirilen erişkin zebra balıklarından üretildi. Sürekli su sirkülasyonu olan zebra balığı sisteminde, pH 7.30, iletkenlik $720 \mu\text{S/cm}$, sıcaklık $28.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ve fotoperiyot 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Zebra balığı embriyoları, ana sistem ile aynı sucul özelliklere ve doğrudan ana sistem tarafından beslenen su sirkülasyonuna bağlı filtreli bir yetiştirme sistemi (iSpawn, Tecniplast, İtalya) ile elde edildi. Döllenen yumurtalar 3 saat içinde toplandı ve $28.5 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta standart embriyo suyu içerisinde, etüvde muhafaza edildi.

D. rerio yumurta ve larvaları, İnönü Üniversitesi Araştırma Kurulu (Araştırma Protokolü No. 2021/4-2) tarafından onaylanan hayvan protokollerine uygun olarak elde edildi.

Kimyasallar ve maruziyet

Diklofenak sodyum (98% saflıkta, CAS NO: 15307-79-6) ACROS Organics™'den temin edildi. Toksikite testlerinde her bir konsantrasyon için tercih edilen embriyo sayısı ve uygulama şekli OECD 236 nolu Balık Embriyo Akut Toksikite (Fish Embryo Acute Toxicity) testine göre belirlendi (OECD, 2013). Öncelikle, diklofenak sodyumun zebra balıkları embriyolarında öldürücü konsantrasyonunu (LC_{50}) belirlemek için ön toksisite testleri yapıldı. Bu çalışmalardan elde edilen verilerden hareketle LC_{50} belirleme testinde kullanılacak konsantrasyonlar belirlendi. Balık embriyo-toksikite testi için döllenen sonrası 6-8 saatlik zebra balığı embriyoları 96 saat boyunca 9 farklı konsantrasyonda ($5.33-0.21 \text{ mg L}^{-1}$) DKFS'ye 96 kuyucuklu mikroplakalarda maruz bırakıldı. Her bir kuyucuğa, 250 μl olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan DKFS çözeltisi ve bir zebra balığı embriyosu eklendi. Her bir konsantrasyon için toplam 24 embriyo kullanıldı. 96 saatlik süre boyunca her 24 saatte bir stereo mikroskop ile incelenen bireylerin ölüm oranları kaydedildi. 48. saatte embriyoların dakikadaki kalp atım sayıları belirlendi. 96. saatin sonunda ise hayatta kalan bireylerin malformasyon oranları ve malformasyon tipleri stereo mikroskop ile belirlenirken boy uzunlukları Euromex Image Focus 4.0 yazılımı kullanılarak ölçüldü.

İstatistiksel analiz

Toplanan verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 5 (SPSS Inc., ABD) ile yapıldı. Embriyolar için 96 saatlik ortalama öldürücü konsantrasyon (LC₅₀) değerini ve efektif konsantrasyonu (EC₅₀) belirlemek için probit regresyon analizi kullanıldı (EPA, ver. 1.5).

Bütün ölçüm parametreleri normal dağılım göstermediğinden, parametrik olmayan bu veriler Kruskal Wallis ve Dunns Testleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. DKFS'nin teratojenik indeks (TI) değeri ise 96h LC₅₀ değerinin 96h EC₅₀ değerine oranı olarak hesaplandı.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Farmasötik bileşikler insan ve hayvan sağlığı için elzemdir; bununla birlikte, dünya genelinde insan nüfusu ve hayvan popülasyonlarında meydana gelen yoğun artış, farmasötik bileşiklere olan talebi de arttırarak çevrede bu bileşiklerin birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle, son yıllarda farmasötik atıklar için biyolojik verilerin kullanılması giderek artan bir oranda ilgi görmektedir. Farmasötiklerin ekotoksitesitesi ile ilgili temel endişe, esas olarak tatlı ve tuzlu sulardaki su kütlelerinde kronik birikimlerinde yatmaktadır (Khan ve ark., 2019). Farmasötik bileşiklerden biri olan DKFS'nin çevresel konsantrasyonlarda bile birçok sucül organizma için

toksik olduğu ve bu organizmaların karaciğer, böbrek, solungaç gibi organlarında olumsuz etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Guiloski ve ark., 2015; Fu ve ark., 2020).

Yüksek miktarlarda üretilen ve kullanılan farmasötiklerin etkileri, çevreye girme ve çevrede zamanla birikme olasılığı göz önünde bulundurularak belirlenmelidir. Bu çalışmada 0.21-5.33 mg L⁻¹ arasındaki konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan zebra balığının embriyonik gelişimi üzerindeki olası toksisitesini ve teratojenitesini değerlendirmek için, embriyoların hayatta kalma oranı, kuluçka oranı ve vücut uzunluklarındaki değişimleri analiz edilmiştir. DKFS'ye maruz kalan *D. rerio* embriyolarında 48, 72 ve 96 saatlik LC₅₀ değerleri sırasıyla 2.04 (1.76-2.38), 1.74 (1.49-2.04) ve 1.55 (1.32-1.83) mg L⁻¹ olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada, DKFS'nin 5.33 ve 3.56 mg L⁻¹ konsantrasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında ölümler genellikle 24. saatte gözlenmiştir (Çizelge 1). Johnson ve ark. (2007) balık gelişiminde gastrulasyon ve segmentasyon olaylarının meydana geldiği 5-24 saat aralığının balık gelişiminde kritik dönem olarak adlandırıldığını bildirmiştir. Bu durum verilerimizle uyumludur. Diğer yandan, 0.21 ve 0.31 mg L⁻¹ konsantrasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında ölüm gözlenmemiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan *D. rerio* embriyoları için zamana bağlı ölüm seviyeleri

Table 1. Time-dependent mortality levels for *D. rerio* embryos exposed to different concentrations of DKFS

Konsantrasyon (mg L ⁻¹)	n	Σ (Mortalite)			
		24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
Kontrol	24	0	0	0	0
0.21	24	0	0	0	0
0.31	24	0	0	0	0
0.47	24	0	1	1	2
0.70	24	0	1	2	3
1.05	24	2	2	5	7
1.58	24	5	6	9	11
2.37	24	7	14	17	17
3.56	24	18	20	20	21
5.33	24	24	24	24	24

DKFS'ye maruz kalan embriyolarda EC₅₀ değeri ise 0.81 (0.69-0.96) mg L⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan LC₅₀ değerinin EC₅₀ değerine oranı teratojenite değerini vermektedir. Teratojenite değeri kirleticilerin sucül organizmalar üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir ölçüttür. Teratojenite belirleme çalışmalarında alternatif modellerden biri zebra balığı embriyolarını kullanarak yapılan testlerdir (Kelly ve ark., 2010; Sipes ve ark., 2011; Tenorio-Chávez ve ark., 2020). Memeli organizmalarda kimyasal maddelerin

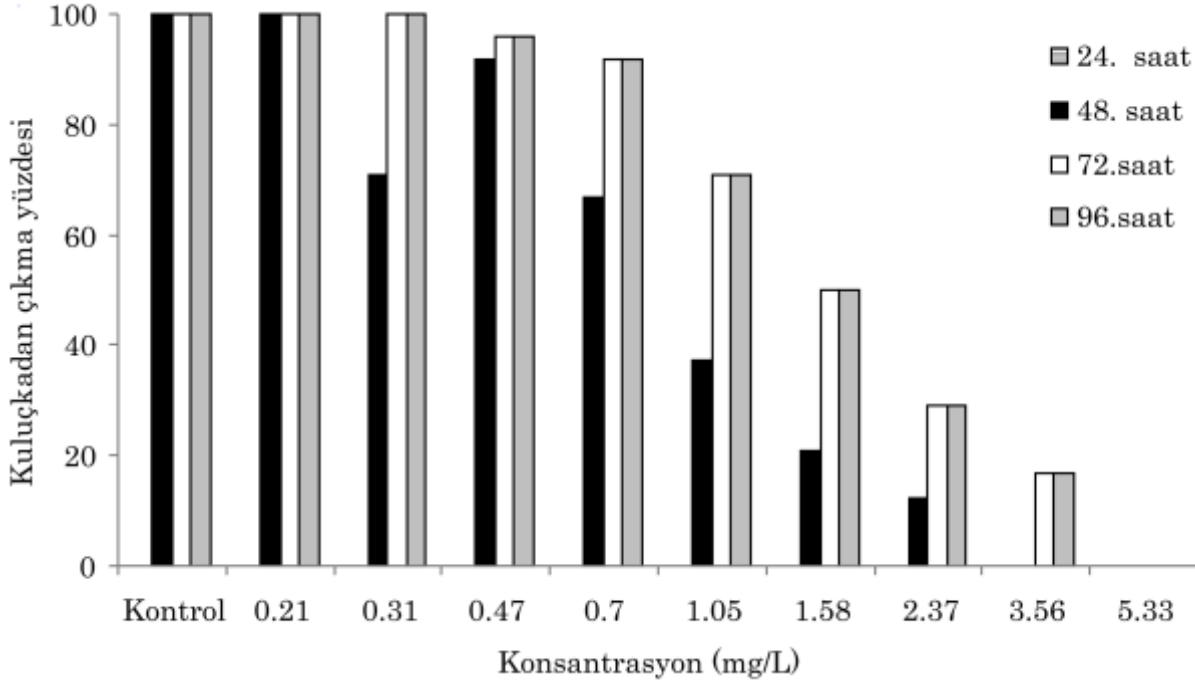
teratojenik potansiyelini belirlemek için de zebra balığı embriyolarının kullanılmasının uygunluğu bir çok çalışma ile ortaya konmuştur (Teixido ve ark., 2013).

DKFS, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından gebelik riski sınıfı C ilacı olarak belirlenmiştir. Bu bileşik kadınlarda dismenore ve menorajiyi tedavi etmek için sıkça kullanıldığından, potansiyel teratojenik etkileri değerlendirmek için yeterli ve kontrollü çalışmalar yapılması gerektiği bildirilmiştir. Bu çalışmada, zebra balıkları larvaları

için Teratojenik İndeks (TI) değeri 1.91 olarak hesaplanmıştır. Selderslaghs ve ark. (2009) göre test bileşikleri ile ilgili olarak TI değeri >1 ise bileşik teratojenik olarak kabul edilir. Buna göre bulgularımız DKFS'nin *D. rerio* larvaları için teratojenik olduğunu göstermiştir.

Zebra balıkları embriolarında kuluçkadan çıkma oranı, çevresel kirleticilerin neden olduğu toksisite değerlendirmesi için kullanılan önemli bir ölçütlerden biridir (Mu ve ark., 2016). 28.2 °C de etüvde kuluçkaya bırakılan zebra balığı embriolarının 50-60 saat sonunda yumurtadan çıkmaları beklenmektedir

(Xia ve ark., 2017). Kontrol grubundaki embriolar için, kuluçka 48. saatte başlamış ve hayatta kalan embrioların neredeyse tamamı 72. saatte yumurtadan çıkmıştır. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, tüm maruziyet gruplarında embrioların yumurtadan çıkma oranları 72. saatte daha düşüktür, ancak hayatta kalan bireylerin tümü 96. saatte yumurtadan çıkmıştır. Bununla birlikte 3.56 mg L⁻¹ konsantrasyonda 72. saatte yumurtadan çıkma oranında önemli düzeyde inhibisyon (%16.7) gözlenmiştir (Şekil 1).



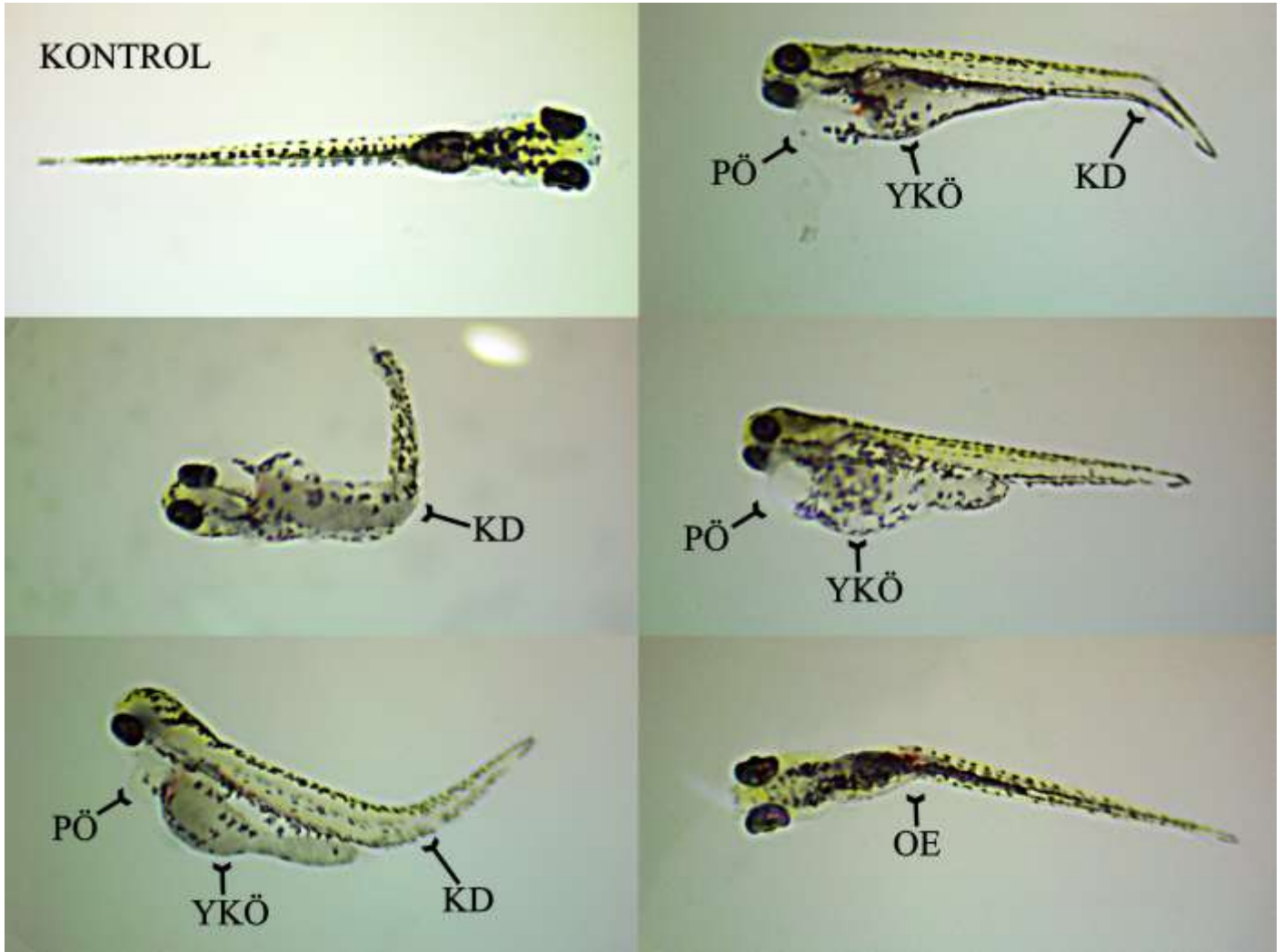
Şekil 1 Farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz kalan *D. rerio* embriolarında kuluçkadan çıkma yüzdesi
Figure 1. Percent hatching in *D. rerio* embryos exposed to different concentrations of DKFS

Kuluçka genellikle biyokimyasal, biyofiziksel ve ozmotik mekanizmaların kombinasyonundan oluşmaktadır ve kuluçkada gözlenen inhibisyon, DKFS'nin bu mekanizmaları olumsuz etkilediğini göstermektedir. Ayrıca, kuluçkadan çıkmada meydana gelen gecikme, daha yavaş bir gelişim hızına bağlanabilmektedir (Johnson ve ark., 2007). Aksakal ve Çiltaş (2020), zebra balıklarında kirleticiye maruz kalan embrioların kuluçka başarısındaki azalmayı kuluçka enziminin inhibisyonuna veya kuluçka bezi hücrelerinin salgılama fonksiyonunun bloke edilmesine bağlanabileceğini bildirmişlerdir. Capriello ve ark. (2021) ise zebra balıkları embriolarında kuluçkadan çıkma oranındaki inhibisyonun, embriyonun kaslarında meydana gelen etkilere bağlı olarak gerekli hareketlerin engellenmesinden kaynaklanabileceğini ve bu etkilerin kuluçkadan çıktıktan sonra bile yüzme performansında belirgin bir düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir. Lee ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada 0.001-10

mg L⁻¹ konsantrasyonda DKFS'ye maruz bırakılan *Japanese medaka*'nın kuluçkadan çıkma başarısında, konsantrasyona bağlı olarak önemli oranda azalma gözlenmiştir. Ancak Stepanova ve ark. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada 3 mg L⁻¹ konsantrasyonda DKFS'ye maruz bırakılan sazan balıklarında kuluçkadan çıkma başarısında herhangi bir azalma gözlenmemiştir.

DKFS'ye maruz bırakılan zebra balıklarında perikardiyal ödem (PÖ), yolk kesesi ödemi (YKÖ), kuyruk deformasyonu (KD) ve omurga eğriliği (OE) gibi malformasyonlar belirlenmiştir (Şekil 2).

3.56, 2.37 ve 1.58 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda hayatta kalan tüm bireylerde malformasyon gözlenmiştir. 1.05, 0.70 ve 0.47 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda hayatta kalan bireylerde sırasıyla %65, %29 ve %18 oranında malformasyon gözlenmiştir. PÖ ve YKÖ ödemi diğer malformasyon tiplerine göre daha sık gözlenmiştir (Çizelge 2).



Şekil 2. 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan embriyolarda görülen malformasyon tipleri. YKS: yolk kesesi ödemi; PÖ: perikardiyal ödem; KD: kuyruk deformasyonu; OE: omurga eğriliği

Figure 2. The types of malformations seen in embryos exposed to DKFS for 96 hours in different concentrations. YKO: yolk sac edema, PÖ: pericardial edema; KD: tail deformation; OE: spinal curvature

Bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde, Escapa ve ark. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada DKFS'nin zebra balıklarında PÖ ve YKÖ'ye neden olduğunu göstermiştir. PÖ oluşumu anormal kardiyak gelişimin, ozmotik veya metabolik fonksiyonlarının bozulmasının göstergesi olabileceği rapor edilmiştir. Ayrıca YKÖ'nün kalbe, besin sağlanmasını engelleyebileceğini ve bunun da PÖ ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir. Diğer yandan, bu çalışmaya benzer şekilde Pohl ve ark. (2019) 7.5 ve 15 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda DKFS'nin zebra balıklarında 48. saatte PÖ ve YKÖ'ye neden olduğunu ve 144. saatte ise %100 ölüme neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Zebra balıklarında gözlenen omurga eğriliğinin omurga kolonunda düzensiz wnt sinyalinin veya azalmış kollajenin sonucu oluşabileceği rapor

edilmiştir. Omurga deformasyonu, zebra balıklarının normal gelişimi için gerekli olan kalsiyum ve fosfor iyonu eksikliğinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Gonzalez ve ark. 2021).

PÖ, DKFS'nin neden olduğu ana malformasyon türü olduğundan, perikardiyal morfolojideki değişikliğin embriyoların kalp fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini analiz etmek için kalp atışı hızı belirlenmiştir. Kalp, zebra balıklarında geliştirilen ilk fonksiyonel organdır ve kirleticilerin etkilerinden dolayı kalp atım hızında meydana gelen değişiklik, embriyonik testlerinde kullanılan önemli bir belirteçtir (Zhang ve ark., 2020). Bu çalışmada, DKFS'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarının 48. saat kalp atış hızlarında doza bağlı olarak önemli oranda azalmaya neden olduğunu gösterilmiştir (Şekil 3). Literatürde, ilaçların zebra balıkları

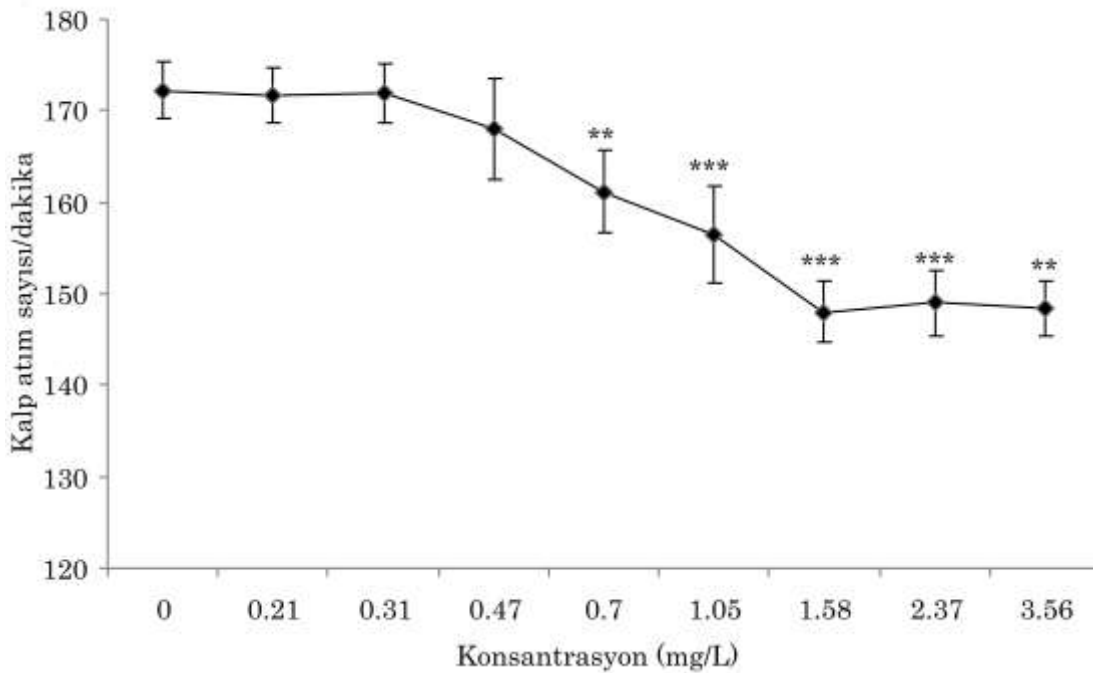
embriyolarında kalp atım sayılarında inhibisyona neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lin ve ark., 2013; Sun ve ark., 2013; Wang ve ark., 2014; Yin ve ark., 2014; Chen ve ark.,

2017; Shen ve ark., 2019). Ayrıca Zhang ve ark., (2020) kirleticilerin öldürücü olmayan dozlarının zebra balıklarında kalp atım hızını etkileyebileceğini rapor etmişlerdir.

Çizelge 2. 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan *D. rerio* larvalarında malformasyon gözlenen birey ve malformasyon sayıları

Table 2. The number of individuals and malformations observed in *D. rerio* larvae exposed to different concentrations of DKFS for 96 hours

Konsantrasyon mg L ⁻¹	Hayatta kalan birey sayısı	Malformasyon gözlenen birey sayısı	Malformasyon Tipleri			
			PÖ	YKÖ	OE	KY
Kontrol	24	0	-	-	-	-
0.21	24	0	-	-	-	-
0.31	24	0	-	-	-	-
0.47	22	4	3	4	2	2
0.70	21	6	4	6	1	0
1.05	17	11	9	10	4	3
1.58	13	13	11	12	8	5
2.37	7	7	7	7	6	4
3.56	3	3	3	3	1	2
5.33	0	0				



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz kalan *D. rerio* embriyolarında 48. saat dakikada kalp atım sayısı

Figure 3. Heart rate per minute at 48 hours in *D. rerio* embryos exposed to different concentrations of DKFS

*Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.05$)

**Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.01$)

***Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.001$)

Kirleticilerin balıklar üzerindeki potansiyel etkilerinin değerlendirilmesinde vücut boyu değişiminin belirlenmesi önemli bir parametredir (Yang ve ark., 2018; Seçer ve ark., 2022). Çünkü balıkların boy uzunluğundaki değişim, kirleticilerin etkisine bağlı olarak bireyde oluşabilecek birçok

moleküler ve hücrel yanıtı önemli oranda yansıtmaktadır (Cook ve ark. 2005). Bu çalışmada, kontrol grubuna göre DKFS'ye maruz bırakılan embriyoların vücut uzunluklarında önemli oranda bir inhibisyon gözlenmiştir (Çizelge 3). Bu çalışmadan farklı olarak, Horie ve ark. (2018) tarafından yapılan

bir çalışmada 0.4-3.5 mg L⁻¹ arası konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan zebra balıklarının boy uzunluklarında önemli bir fark gözlenmemiştir. Ayrıca Stepanova ve ark. (2013) tarafından yapılan

bir çalışmada 3 mg L⁻¹ konsantrasyonda DKFS'ye maruz bırakılan sazan balıklarının boy uzunluklarında önemli bir fark belirlenmemiştir.

Çizelge 3. 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda DKFS'ye maruz bırakılan *D. rerio* larvalarının boy uzunlukları

Table 3. Length of *D. rerio* larvae exposed to different concentrations of DKFS for 96 hours

Konsantrasyon mg L ⁻¹	Hayatta kalan birey sayısı	Boy uzunluğu (mm) ^a			
Kontrol	24	3.47	±	0.13	
0.21	24	3.41	±	0.15	
0.31	24	3.40	±	0.16	
0.47	22	3.32	±	0.16	
0.70	21	3.27	±	0.15	*
1.05	17	3.12	±	0.43	**
1.58	13	3.13	±	0.24	**
2.37	7	2.68	±	0.30	***
3.56	3	2.46	±	0.40	**
5.33	0				

Her konsantrasyon için 24 birey maruz bırakıldı.

^aUzunluklar ortalama ± standart hatalar olarak ifade edilir. Bu değerler hayatta kalan bireylerin uzunluklarından elde edilmiştir.

*Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.05$)

**Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.01$)

***Kontrolden önemli ölçüde farklı olan grupları gösterir ($p < 0.001$)

Bu çalışmada, DKFS'nin 3.56-1.05 mg L⁻¹ arası konsantrasyonlarına maruz kalan zebra balıklarında, hem boy uzunluklarında meydana gelen azalma hem de YKÖ'nün yoğun olarak gözlenmesi bu bireylerde gelişim geriliği oluştuğunu düşündürmektedir. Johson ve ark. (2007) yolk kesesi alanının artmasını ve buna eşlik eden boy uzunluğundaki azalmayı, toksisite testlerinde yaygın olarak görüldüğünü ve bu durumu gelişim geriliği ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir. DKFS'nin, sucul organizmalarda gelişimsel toksisite, teratojenite ve embriyogenez üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğinden bu etkilerin altında yatan mekanizmaların ayrıntılı olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma DKFS'nin zebra balığı embriyolarında doza bağlı olarak gelişimsel toksisiteye neden olduğunu göstermiştir. Toksisite verileri ve hesaplanan TI değeri DKFS'nin zebra balıkları embriyoları için teratojen olduğunu da göstermiştir. Yolk kesesi ödemi, perikardiyal ödem, kuluçka anormallikleri, kuyruk deformasyonu ve omurga eğriliği gibi yanıtlar toksisite ve teratojenite ile ilgili iddiayı desteklemektedir. DKFS'nin yüzeysel sularında potansiyel birikiminin sucul organizmalarda neden olabileceği etkiler bu kontrollü deneyde çeşitli yönlerden ortaya konmuştur. Ancak yapılacak yeni çalışmalar ile hem DFKS toksisitenin hem de teratojenitesinin olası mekanizmalarının biyokimyasal ve moleküler düzeyde değerlendirilmesi

önemli bir gerekliliktir. Diğer yandan, bu tür çevresel kimyasalların sucul organizmalar için toksik konsantrasyonları ve toksisite mekanizmalarının belirlenimin yanı sıra Pohl ve ark. (2019) tarafından yapılan, ozonlayarak DFKS'nin toksik etkileri giderimi şeklindeki çalışmalarla bu tür maddelerin sudan uzaklaştırılması veya en azından toksik etkilerinin giderilmesi ekosistem ve insan sağlığı açısından yerinde olacaktır.

TEŞEKKÜR

Yazar, sağladığı laboratuvar olanakları için Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e, çalışmanın ve makale yazımının her aşamasında desteklerinden dolayı Prof. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye ve laboratuvar çalışmalarında ki teknik destekten dolayı Nazan BATTALOĞLU'na teşekkür eder.

KAYNAKLAR

- Aksakal, F.I. & Çiltaş, A. (2018). Developmental Toxicity of Penconazole in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Chemosphere*, 200, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.094>
- Capriello, T., Visone, I.M., Motta, C.M., Ferrandino, I. (2021). Adverse Effects of E150d on Zebrafish Development. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111877. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111877>
- Chen, B., Gao, Z.Q., Liu, Y., Zheng, Y.M., Han, Y., Zhang, J.P. & Hu, C.Q. (2017). Embryo and Developmental Toxicity of Cefazolin Sodium Impurities in Zebrafish. *Frontiers in*

- Pharmacology*, 8, 403. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00403>
- Cook, L.W., Paradise, C.J., Lom, B. (2005). The Pesticide Malathion Reduces Survival and Growth in Developing Zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(7), 1745-1750. <https://doi.org/10.1897/04-331R.1>
- Daou, C., Hamade, A., Mouchtari, E.M., Rafqah, S., Piram, A., Chung, P.W.W. & Najjar, F. (2020). Zebrafish Toxicity Assessment of The Photocatalysis-Biodegradation of Diclofenac Using Composites of TiO₂ and Activated Carbon From *Argania spinosa* Tree Nutshells and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 17258–17267. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08276-4>
- Escapa, C., Torres, T., Neuparth, T., Coimbra, R.N., García, A.I., Santos, M.M., & Otero, M. 2018. Zebrafish Embryo Bioassays for a Comprehensive Evaluation of Microalgae Efficiency in the Removal of Diclofenac from Water. *Science of The Total Environment*, 640 (641), 1024-1033. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.353>
- Felice, B.D., Cobia, L. & Guida, M. (2012). Gene Expression Profiling in Zebrafish Embryos Exposed to Diclofenac, an Environmental Toxicant. *Molecular Biology Reports*, 39, 2119–2128. <https://DOI.10.1007/s11033-011-0959-z>
- Fu, Q., Fedrizzi, D., Kosfeld, V., Schlechtriem, C., Ganz, V., Derrer, S., Rentsch, D., & Hollender, J., (2020). Biotransformation Changes Bioaccumulation and Toxicity of Diclofenac in Aquatic Organisms. *Environmental Science Technology*, 54, 4400–4408. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07127>
- González, E.D., Gómez-Oliván, L.M., Islas-Flores, H., & Galar-Martínez, M. (2021). Developmental Effects of Amoxicillin at Environmentally Relevant Concentration Using Zebrafish Embryotoxicity Test (ZET). *Water Air Soil Pollution*, 232, 196. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05148-6>
- Guiloski, I.C., Ribas, J.L.C., Pereira, L.S., Neves, A.P.A. & Assis, H.C.S.A. (2015). Effects of Trophic Exposure to Dexamethasone and Diclofenac in freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.11.020>
- Horie, Y., Yamagishi, T., Yagi, A., Shintaku, Y., Iguchi, T. & Tatarazako, N. (2018). The Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Diclofenac Sodium Induces Abnormal Embryogenesis and Delayed Lethal Effects in Early Life Stage Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Applied Toxicology*, 39, 622–629. <https://doi.org/10.1002/jat.3752>
- Jia, M., Teng, M., Tian, S., Yan, J., Meng, Z., Yan, S., Li, R., Zhou, Z., & Zhu, W. (2020). Developmental Toxicity and Neurotoxicity of Penconazole Enantiomers Exposure on Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 267, 115450. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115450>
- Johnson, A., Carew, E., & Sloman, K.A. (2007). The Effects of Copper on The Morphological and Functional Development of Zebrafish Embryos. *Aquatic Toxicology*, 84, 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.003>
- Kelly, P.J.M., Zhang, C.X., Danberyy, T.L., Flood, A., Delan, J.W., Brannen, K.C., & Augustine-Rauch, K.A. (2010). Morphological Score Assignment Guidelines for The Dechorionated Zebrafish Teratogenicity Assay. *Birth Defects Research (Part B)*, 89, 382–395. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20260>
- Khan, K., Benfenati, E. & Roy, K. (2019). Consensus Qsar Modeling of Toxicity of Pharmaceuticals To Different Aquatic Organisms: Ranking And Prioritization of The Drug Bank Database Compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 287-297. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.060>
- Koba, O., Grabicova, K., Cervený, D., Turek, J., Kolarova, J., Randak, T., Zlabek, V. & Grabic, R. (2018). Transport of Pharmaceuticals and Their Metabolites Between Water and Sediments as a Further Potential Exposure for Aquatic Organisms. *Journal of Hazardous Materials*, 342, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.039>
- Lee, J., Ji, K., Kho, Y.L., Kim, P. & Choi, K. (2011). Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladocerans and *Japanese medaka*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1216-1225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.014>
- Lin, T., Chen, Y., & Chen, W. (2013). Impact of Toxicological Properties of Sulfonamides on the Growth of Zebrafish Embryos in the Water. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 3, 1068–1076. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.009>
- Mirzaee, S.A., Noorimotlagh, Z., Ahmadi, M., Rahim, F., Martinez, S.S., Nourmohammadi, A. & Jaafarzadeh, N. (2021). The Possible Oxidative Stress and DNA Damage Induced in Diclofenac-Exposed Non-target Organisms in The Aquatic Environment: A Systematic Review. *Ecological Indicators*, 131, 108172. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108172>
- Mu, X., Chai, T., Wang, K., Zhu, L., Huang, Y., Shen, G., Li, Y., Li, X. & Wang, C. (2016). The Developmental Effect of Difenoconazole on Zebrafish Embryos: A mechanism research. *Environmental Pollution*, 212, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.01.035>
- Nguyen, T.H., Nguyen, P.D., Leclercq, J.Q., Muller, M., Huang, D.T.L., Pham, H.T., & Kestemont, P. (2021). Developmental Toxicity of *Clerodendrum cyrtophyllum* Turcz Ethanol Extract in Zebrafish

- embryo. *Journal of Ethnopharmacology*, 267, 113538. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113538>
- OECD 236, Guidelines for the testing of Chemicals, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 2013.
- Pohl, J., Ahrens, L., Carlsson, G., Golovko, O., Norrgren, L., Weiss, J., & Örn, S. (2019). Embryotoxicity of ozonated diclofenac, carbamazepine, and oxazepam in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 225, 191-199. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.034>
- Santos, E.H.Q., Martínez, M.G., Medina, S.G., Pérez, E.G., Viveros, S.C., Lara, K.R., Oliv, L.M.G. & Flores, H.I. (2021). Geno-Cytotoxicity and Congenital Malformations Produced by Relevant Environmental Concentrations of Aluminum, Diclofenac and Their Mixture on *Cyprinus carpio*. An Interactions Study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82, 103555. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103555>
- Seçer, B., Doğan, M., Sungur, S. & Çiçek, E. (2022). Yapraklı Barajı (Burdur/Göhlisar) *Alburnus carianorum* (Teleostei: Cyprinidae) Populasyonuna ait Yaş, Büyüme ve Ölüm Parametreleri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 25 (3), 533-538. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogav.879677>
- Selderslaghs, I.W.T., Rompay, A.R.V., Coen, W., Selderslaghs, I.W.T., Rompay, A.R.V. & Coen, W. (2009). Development of a Screening Assay to Identify teratogenic and Embryo Toxic Chemicals Using the Zebrafish Embryo. *Reproductive Toxicology*, 28, 308-320. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.05.004>
- Shen, R., Yu, Y., Lan, R., Yu, R., Yuan, Z. & Xia, Z. (2019). The Cardiovascular Toxicity Induced By High Doses of Gatifloxacin and Ciprofloxacin in Zebrafish. *Environmental Pollution*, 254, 112861. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.029>
- Sipes, N.S., Padilla, S. & Knudsen, T.B., (2011). Zebrafish—As an Integrative Model for Twenty-First Century Toxicity Testing. *Birth Defects Research (Part C)*, 93, 256-267. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20214>
- Stepanova, S., Praskova, E., Chromcova, L., Plhalova L, Prokes, M., Blahova, J. & Svobodova, Z. (2013). The effects of diclofenac on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 454-460. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.011>
- Sun, L., Xin, L., Peng, Z., Jin, R., Jin, Y., Qian, H. & Fu, Z. (2013). Toxicity and Enantiospecific Differences of Two β -Blockers, Propranolol and Metoprolol, in The Embryos and Larvae of Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 29, 1367-1378. <https://doi.org/10.1002/tox.21867>
- Teixidó, E., Piqué, E., Gómez-Catalán, J. & Llobet, J.M. (2013). Assessment of Developmental Delay in The Zebrafish Embryo Teratogenicity Assay. *Toxicology in Vitro*, 27, 469-478. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.07.010>
- Tenorio-Chávez, P., Cerro-López, M., Castro-Pastrana, L.I., Ramírez-Rodriguez, M.M., Orozco-Hernández, J.M. & Gómez-Oliván, L.M. (2020). Effects of Effluent from a Hospital in Mexico on The Embryonic Development of Zebrafish, *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 727, 138716. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138716>
- Wang, H., Che, B., Duan, A., Mao, J., Dahlgren, R.A., Zhang, M., Zhang, H., Zeng, A., & Wang, X. (2014). Toxicity Evaluation of β -diketone Antibiotics on The Development of Embryo-Larval Zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology*, 29, 1134-1146. <https://doi.org/10.1002/tox.21843>
- Xia, L., Zheng, & L., Zhou, J.L. (2017). Effects of Ibuprofen, Diclofenac and Paracetamol on Hatch and Motor Behavior in Developing Zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 182, 416-425 <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.054>
- Yang, X., Sun, Z., Wang, W., Zhou, Q., Shi, G., Wei, F. & Jiang, G. (2018). Developmental Toxicity of Synthetic Phenolic Antioxidants to The Early Lifestage of Zebrafish. *Science of The Total Environment*, 643, 559-568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.213>
- Yin, X., Huili, H., Zhang, Y., Dahlgren, R.A., Zhang, H., Shi, M., Gao, M. & Wang, X. (2014). Toxicological Assessment of Trace β -Diketone Antibiotic Mixtures on Zebrafish (*Danio rerio*) by Proteomic Analysis. *Plos One*, 9(7), 102731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102731>
- Zhang, C., Zhang, J., Zhu, L., Du, Z., Wang, J., Wang, J., Li, B. & Yang, Y. (2020). Fluoxastrobin-Induced Effects on Acute Toxicity, Development Toxicity, Oxidative Stress, and DNA Damage in *Danio rerio* Embryos. *Science of the Total Environment*, 715, 137069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137069>