

Kurşuna Maruz Bırakılan Tilapia (*Oreochromis mossambicus*)'nın Eritrosit Morfolojisinde Görülen Değişimler

Hasan KAYA Mehmet AKBULUT
Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, Çanakkale
e-posta: hasankaya@comu.edu.tr

Geliş Tarihi/Received: 10.02.2012

Özet: Bu çalışmada, in vivo etkide farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılan tilapia (*Oreochromis mossambicus*, L.1758) balığının eritrosit morfolojisinde meydana gelen değişimler araştırılmıştır. Balıklar düşük ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), orta ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) ve yüksek (5 mg L^{-1}) kurşun konsantrasyonlarına semi-statik olarak 14 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Deneme sonunda orta ve yüksek doz kurşuna maruz bırakılan gruplarda kontrol grubuna göre önemli değişimler görülmüştür ($p < 0,05$). Orta ve yüksek dozlarda kurşun eritrosit çekirdek alanı, uzunluğu ve genişliğinde kontrole göre önemli azalmaya neden olurken, sitoplazma alanı ve hücre genişliğinde kontrol grubuna göre önemli bir artma göstermiştir ($p < 0,05$). Artan kurşun konsantrasyonlarının *O. mossambicus* eritrosit hücre morfolojisinde hipertrofi, anizositoz ve karyopiknozise neden olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kurşun, *Oreochromis mossambicus*, Eritrosit Morfolojisi

Changes in Erythrocyte Morphology of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Exposed to Lead

Abstract: In this study, changes of erythrocyte morphology of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*, L.1758) exposing to the different concentrations of lead have been investigated. Fish were exposed to low ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), medium ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) and high (5 mg L^{-1}) lead concentrations semi-statically during 14 days. At the end of the experiment, important changes in the treatment groups exposed to medium and high lead concentrations were shown than the control group ($p < 0,05$). Medium and high doses of lead red blood cell nucleus area, an important reduction in the length and width compared to the control, while the width of the cell cytoplasmic space and the control group showed a significant increase ($p < 0,05$). It was concluded that increasing lead concentrations might cause hypertrophy, anisocytosis and cariopcnosis in erythrocyte cell morphology of *O. mossambicus*.

Keywords: Lead, *Oreochromis mossambicus*, Erythrocyte morphology

1. GİRİŞ

Sucul organizmalarda herhangi bir fizyolojik görevi bulunmayan kurşun, yer kabuğunda doğal olarak bulunan ağır metallere (Eisler, 1988). Kurşun aquatik ekosistemlere kömür, petrol, pestisit, akü, boya ve pil gibi günlük hayatta yoğun olarak kullanılan maddeler sonucu girmektedir. Antropojenik aktiviteler sonucu sulara ulaşan kurşun tüm aquatik organizmalar için toksiktir (Wong ve ark., 1978). Kurşun toksisitesi, canlıların fizyolojik durumuna, türüne, suyun fiziko-kimyasal parametrelerine bağlı olarak değişebilmektedir. Genel olarak kurşun; yüksek su sıcaklığı ve düşük pH'da, nispeten yumuşak sularda, canlıların en genç yaşam safhasında ve uzun süre kurşuna maruz kalındığında daha fazla toksik etki göstermektedir (Eisler, 1988).

Sucul ekosistemlere ulaşan kurşun, balıklar tarafından solungaçlar ve sindirim yolu ile alınabilir. Alınan kurşun emilerek kan dolaşımına girer ve % 95'i kırmızı kan hücrelerine absorpsiyonla bağlanır. Kırmızı kan hücrelerinden plazmaya daha sonra hücreler arası alana geçen kurşun hücre dokusuna ya da hücre içi alanlara diffüze olur. Yumuşak dokulara kolaylıkla geçebilen kurşun; böbrek, beyin, solungaç, kemik ve karaciğer gibi dokularda birikim yapar (Berman, 1980).

Kurşun balıklarda başlıca hematolojik ve nörolojik hasarlara sebep olur (De Michele, 1984). Kurşunun ilk etki mekanizması hematopoetik sistem üzerinde görülür. Delta aminolevulinik asit dehidrataz enzim aktivitesinde inhibisyona neden olan kurşun hemoglobinin sentezinde düzensizliklere yol açarak eritrositlerin yaşam ömrünü azaltır ve bunun sonucunda da anemi görülür (Hodson, 1976; Demayo ve ark., 1982; Schmitt ve ark., 1984; Ruparelia ve ark., 1989).

Toksik maddelere maruz bırakılan balıkların kan hücrelerinin morfolojik özelliklerindeki değişimleri belirlemek, balık sağlığının değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (Hinton, 1993). Ağır metaller eritrosit membranları yoluyla hücre transportuna hasar verir. Aynı zamanda, toksik maddeler eritrosit membranını değiştirerek görevlerini olumsuz olarak etkiler (Hawkey ve ark.,1991; Akahori ve ark., 1999; Cavas ve ark., 2005, Tomova ve ark., 2009).

Bu çalışmada, farklı kurşun konsantrasyonlarına maruz bırakılan tilapia, *O. mossambicus* balığının eritrosit morfolojik özelliklerinden çekirdek alanı, uzunluğu, genişliği ile sitoplazma alanı, hücre genişliği ve uzunluğu araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneme Balığı

Denemede kullanılan tilapia (*Oreochromis mossambicus*) balıkları (n=144) Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Bölümü Laboratuvarından temin edilmiştir.

Deneme Dizaynı

Balıklar, her biri 45x28x80 cm boyutlarında içerisinde 80 L dinlenmiş Çanakkale İli çeşme suyu bulunan 12 stok akvaryumunda 2 ay boyunca ortam koşullarına adapte edilmiştir. Balıklar laboratuvar koşullarına adaptasyon süresince hazırlanan balık yemleriyle (Protein /yağ %35/ %10) beslenmiştir. Deneme 3 tekerrürlü olarak dizayn edilmiş olup her akvaryuma 12 adet balık konulmuştur. Denemeler başlamadan 24 saat önce yemleme kesilmiştir. Deney süresince balıklar vücut ağırlıklarının %2'si kadar yem ile günde iki defa beslenmiştir. Denemede balıklar 14 gün boyunca kontrol (sadece dinlendirilmiş çeşme suyu), 0,5, 2,5 ve 5 mg L⁻¹ Pb(NO₃)₂ konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Konsantrasyonlar literatür bilgileri göz önünde bulundurularak belirlenmiştir (Ay ve ark., 1999). Deneme yarı-statik olarak dizayn edilmiş olup her gün suyun %75'i sabah, %25'i akşam olacak şekilde değişimi yapılmıştır. Her su değişiminden sonra aynı oranda Pb(NO₃)₂ çözeltisi su ile beraber akvaryumlara ilave edilmiştir (Smith ve ark., 2007). Denemede kullanılan dinlendirilmiş çeşme suyunun fiziko-kimyasal parametreleri Tablo 1 de verilmiştir. Denemede 0. gün (herhangi bir kimyasal uygulaması olmadan) ve 14. günde olmak üzere iki defa örnekleme yapılmıştır.

Tablo 1. Denemede kullanılan akvaryum suyunun fiziko-kimyasal özellikleri

Parametre	Değer	Birim	Yöntem
Sıcaklık	25,4±0,3	°C	YSI 556 MPS prob
Çözünmüş oksijen	6,31±0,11	mg L ⁻¹	YSI 556 MPS prob
pH	7,15±0,04	unit	HANNAC200 (HI 83200) fotometre
Toplam amonyak	0,141±0,02	mg L ⁻¹	Thermo aquamate VIS- spektrofotometre
Sertlik	125±6,2	mg CaCO ₃ L ⁻¹	Thermo aquamate VIS- spektrofotometre

Pb(NO₃)₂ Çözeltisinin Hazırlanması ve Akvaryumlara Uygulanması

Denemede Merck marka (Darmstadt/Germany) Pb(NO₃)₂ ağır metal tuzu kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonları hazırlamak için ultra saf su içerisinde ana stok çözelti hazırlanmış ve buradan da uygun seyreltmeler yapılarak deneme konsantrasyonları elde edilmiştir. Deneylerde Pb(NO₃)₂ çözeltisinin akvaryumlarda homojen dağılması ve akvaryum tabanına çökmesini önlemek amacıyla trisodyum sitrat dihidrat (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) çözeltisi kullanılmıştır.

Kan Örneklerinin Alınması ve İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler

Denemede periyotlarında alınan balıklara MS222 ile anestezi uygulanmış (Smith ve ark., 2007), kana mukoza karışmaması amacıyla iyice kurulanıp temizlendikten sonra, 5 ml' lik plastik enjektörle kaudal venadan girilerek balığa zarar vermeden kan alınmıştır (Val ve ark., 1998). Kırmızı kan hücre ölçümleri (sitoplazma, çekirdek alanı, genişliği ve uzunluğu) yayma preparasyonlardan Novel XS2 107T marka mikroskop kullanılarak Image Pro Plus Vers. 6.0 analiz programında yapılmıştır. Her bir deneme grubu için on balık (n=10) alınmış ve her örnek için yüz (n=100) hücre incelenmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme

Denemede elde edilen verilerin istatistiksel analizleri Minitab 13.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Verilere tek yönlü varyans analizi uygulanmış, farklı olan gruplar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Gruplar arası farklar p<0,05 olarak değerlendirilmiştir (Logan, 2010).

3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

O. mossambicus' da farklı kurşun konsantrasyonlarının 0 ve 14. günlerde eritrosit morfolojisi üzerine yaptığı etkiler Tablo 2 ve Tablo 3'de gösterilmiştir.

Elde edilen bulgulara göre eritrosit çekirdek alanında, uzunluğunda ve genişliğinde ikinci hafta sonunda orta ve yüksek doz gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir azalma (p<0,05) gözlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Kurşunun *O. mossambicus*' da eritrosit çekirdeğinde meydana getirdiği değişimler

	Zaman (Günler)	Kontrol (0)	Düşük Doz (0,5 mg L ⁻¹)	Orta Doz (2,5 mg L ⁻¹)	Yüksek Doz (5 mg L ⁻¹)
Eritrosit Çekirdeği	Alanı	(0.gün)	33,952± 1,062		
		(14.gün)	32,998± 0,981 ^a	32,202± 0,680 ^a	27,856± 1,512 ^b
	Uzunluk	(0.gün)	7,857± 0,059		
		(14.gün)	7,844± 0,119 ^{ab}	7,904± 0,049 ^a	7,638± 0,078 ^{bc}
	Genişlik	(0.gün)	5,530± 0,203		
		(14.gün)	5,397± 0,247 ^a	5,269± 0,079 ^a	4,963± 0,061 ^{ab}

*Aynı satır ve özellikle farklı harflerle gösterilen konsantrasyonların ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05). n=10 (balık), n=100 (hücre) ortalama ± standart hata.

Eritrosit sitoplazma bulgularında, sitoplazma alanında orta ve yüksek dozda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bir artma (p<0,05) tespit edilmiştir (Tablo 3). Hücre uzunluk bulguları deneme başlangıcı ve sonunda herhangi bir istatistiksel fark (p>0,05) göstermemiştir (Tablo 3). Hücre genişlik bulgularında ise sitoplazma alan bulgularına paralel olarak ikinci hafta sonunda orta ve yüksek dozda kontrole göre önemli bir artma (p<0,05) meydana gelmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Kurşunun *O. mossambicus*' da eritrosit hücrelerinde meydana getirdiği değişimler

	Zaman (Günler)	Kontrol (0)	Düşük Doz (0,5 mg L ⁻¹)	Orta Doz (2,5 mg L ⁻¹)	Yüksek Doz (5 mg L ⁻¹)
Eritrosit Hücre	Sitoplazma Alanı	(0.gün)	186,568± 1,668		
		(14.gün)	186,941± 2,189 ^c	184,711± 2,939 ^c	197,337± 3,387 ^b
	Uzunluk	(0.gün)	19,668± 0,488		
		(14.gün)	19,124± 0,415 ^a	19,104± 0,436 ^a	19,850± 0,257 ^a
	Genişlik	(0.gün)	13,459± 0,283		
		(14.gün)	13,661± 0,190 ^b	13,742± 0,455 ^b	15,392± 0,564 ^a

* Aynı satır ve özellikle farklı harflerle gösterilen konsantrasyonların ortalamaları arasındaki farklar önemlidir (p<0,05). n=10 (balık), n=100 (hücre) ortalama ± standart hata.

Bu çalışmada *O. mossambicus*' da 14 gün süreyle kurşun uygulaması sonucunda 2,5 ve 5 mg L⁻¹ konsantrasyonlarda eritrosit hücre morfolojilerinde bazı değişimler belirlenmiştir. Kurşuna maruz bırakılan balıkların sitoplazma ve eritrosit hücre genişliğindeki artış hipertrofiye neden olmuş olabilir. Ayrıca, balıkların eritrosit hücre çekirdeğinde küçülme meydana gelmesi ve yuvarlak şekil görülmesi karyopiknosiz ve hücre eşitsizliği olan anizositoz ile açıklanabilir. Tomova ve ark. (2009), tarafından yapılan bir çalışmada farklı çinko konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Carassius gibelio* balığında eritrosit hücre şekillerinde bu çalışmaya benzer olarak hipertrofi, karyopiknosiz ve anizositoz görülmüştür.

Yapılan bazı çalışmalarda balıklarda kurşunun eritrositlerde oluşturduğu hasarlar rapor edilmiştir. Hofer (1992), kurşun kirliliği olan Alpin Gölünde *Salvelinus alpinus* türünde eritrosit membran hasarları ve amitoz rastlamıştır. Kurşun ilaveli yemlerle beslenen

Hoplias malabaricus'un eritrositlerinin şeklinde değişiklik ve hücre alanında artma tespit edilmiştir (Oliveira Riberio ve ark., 2006). *In vitro* koşullarda kurşuna maruz bırakılan *Anas platyrhynchos*'da apoptozis hızında artma meydana gelmiştir (Romero ve ark., 2009). Diğer bir çalışmada Witeska ve ark. (2010), *Cyprinus carpio*'da kurşunun eritrosit anomali oluşumunu arttırdığını ve çalışma sonuna kadar yeni hücrelerin oluşmadığını belirtmiştir.

Elde edilen sonuçlardan kurşunun, *O. mossambicus* türünün eritrosit çekirdeğinde hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda eritrosit morfolometrik ölçümleri aquatik çevrede etkili olan kurşun kirliliğinin izlenmesinde alternatif yöntemlerden biri olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Akahori, A. Jozwiak, Z. Gabryelak, T. ve Gondko, R. 1999. Effect of Zinc on Carp (*Cyprinus carpio* L.) Erythrocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology, 123, 209-215.
- Ay, Ö. Kalay, M. ve Canlı, M. 1999. Copper and Lead Accumulation in Tissues of Freshwater Fish *Tilapia zillii* and Its Effects on the Branchial Na, K-ATPase Activity. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62,160-168.
- Berman, E. 1980. Lead in "Toxic Metals and Their Analysis". Heyden and Son LTD., London, 177-182.
- Cavas, T. Garanko, N. ve Arkhipchuk, V. 2005. Induction of Micronuclei and Binuclei in Blood, Gill and Liver Cells of Fishes Subchronically Exposed to Cadmium Chloride and Copper Sulphate. Food and Chemical Toxicology, 43, 569-574.
- Demayo, A. Taylor, M.C. Taylor, K.W. ve Hodson, P.V. 1982. Toxic Effects of Lead and Lead Compounds on Human Health, Aquatic Life, Wildlife Plants and Livestock. CRC Crit. Rev. Environ. Control, 12, 257-305.
- De Michele, S.J. 1984. Nutrition of Lead. Comp. Biochem. Physiol. 78, 401-408.
- Eisler, R. 1988. Lead Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish Wildlife Service Biology Report, 85,1-14.
- Hawkey, C.M. Benet, P.M. Gascoyne, S.C. Hart, M.G. ve Kirkwood, J.K. 1991. Erythrocyte Size, Number and Hemoglobin Content in Vertebrates. British Journal of Haematology, 77, 392 - 397.
- Hinton, D.E. 1993. Toxicologic Histopathology of Fishes: A Systemic Approach and Overview. In: Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms, Couch J.A. ve Fournie J.W., Eds. CRC Press: Boca Raton, 177-216.
- Hodson, P.V. 1976. Delta-amino Levulinic Acid Dehydratase Activity of Fish Blood as an Indicator of a Harmful Exposure to Lead. J. Fish. Res. Board Can., 33, 268-271.
- Hofer, R. 1992. Heavy Metal Intoxication of Arctic Charr (*Salvelinus a. alpinus*) in a Remote Acid Alpine Lake. EIFAC/XVII/Symp. E31 Lugano 1.
- Logan, M. 2010. Biostatistical Design and Analysis Using R: A Practical Guide. Wiley- Blackwell, London. 546s.
- Oliveira Ribeiro, C.A. Filipak Neto, F. Mela, M. Silva, P.H. Randi, M.A.F. Rabitto, I.S. Alves Costa, J.R.M. Pelletier, E. 2006. Hematological Findings in Neotropical Fish *Hoplias malabaricus* Exposed to Subchronic and Dietary Doses of Methylmercury, Inorganic Lead, and Tributyltin Chloride. Environ. Res. 101, 74.
- Romero, D. Hernandez-Garcia A., Tagliati C A., Martinez-Lopez E., Garcia-Fernandez A J., 2009. Cadmium- and Lead-Induced Apoptosis in Mallard Erythrocytes (*Anas platyrhynchos*). Ecotoxicol. Environ. Saf.72, 37.
- Ruparelia, S.G. Verma, Y. Mehta, N.S. ve Salyed, S.R. 1989. Lead- Induced Biochemical Changes in Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 43, 310-314.
- Schmitt, C.J. Dwyer, F. J. ve Finger, S. E. 1984. Bioavailability of Pb and Zn from Mine Tailings as Indicated by Erythrocyte -Aminolevulinic Acid Dehydratase (ALA-D) Activity in Suckers (Pisces: Catostomidae). Can. J. Fish. Aquat. Sci., 41, 1030-1040.
- Smith, C. Shaw, B. ve Handy, R.D. 2007. Toxicity of Single Walled Carbon Nanotubes to Rainbow Trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory Toxicity, Organ Pathologies, and Other Physiological Effects. Aquatic Toxicology, 82(2), 94-109.

- Tomova, E .S. Velcheva, E. G. ve Arnaudov, A.D. 2009. Influence of Copper And Zinc on the Erythrocyte-Metric Parameters of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae) Bulgarian Journal of Agricultural Science, 15 (3), 183-188.
- Val, A.L. De Menezes, G.C. ve Wood, C.M. 1998. Red Blood Cell Adrenergic Responses in Amazonian Teleost. J. Fish. Biol., 52,83-93.
- Witeska, M. Kondera, E. Szymanska, M. Ostrysz, M. 2010. Hematological Changes in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) After Short-Term Lead (Pb) Exposure. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 19, No. 4, 825-831.
- Wong, P.T.S. Silverberg, B.A. Chau, Y. K. ve Hodson, P. V. 1978. Lead and the Aquatic Biota. 279-342 in J.O. Nriagu (ed.). The Biogeochemistry of Lead in the Environment. Part B. Biological Effects. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 397s.