

Ham Petrolün Suda Çözünebilen Kısımlarının *Xiphophorus hellerii* (Heckel, 1848) (Poeciliidae, Teleostei) Baş Böbreği Üzerine Etkileri

Özlem ÖNEN^{1,*}, Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ²

¹ Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars

² Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

8-5A

Özet: Çok farklı alanlarda kullanılan ham petrol, taşınma ve iletimi sırasında oluşabilecek yayılmalar başta olmak üzere, çıkarılmasından son kullanıcıya kadar tüm süreçlerde ve bütün çevre fazlarında kirliliğe neden olur. Bu çalışmada ham petrol yayılımları sonucu oluşabilecek çevre ve sağlık sorunlarına ışık tutabilmek amacıyla, *Xiphophorus hellerii* örneklerinin baş böbreği dokusunda ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının toksik etkileri araştırıldı. Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının memelilerde hematopoezisi olumsuz etkilediğine dair bilgiler olsa da teleost kan yapım süreçlerine etkisinin olup olmadığı netlik kazanmamıştır. Bu çalışmada ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının *Xiphophorus hellerii*'de (kılıçkuyruk) kan hücreleri oluşturan dokulardan baş böbreği üzerindeki histopatolojik olarak akut etkilerinin etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Ticari akvaryumculardan sağlanan 20 adet ergin erkek *X. hellerii* örneği (ağırlık: $3 \pm 0,5$ gr, uzunluk: 6 ± 1 cm) iki haftalık adaptasyon süresinden sonra her biri onar balıktan oluşan bir deneme ve bir kontrol grubu olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamış olup; deneme grubu örnekleri 96 saat süreyle %40 konsantrasyondaki ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda MS 222 ile uyuşturulan kontrol ve deneme grubu örneklerinden alınan baş böbreği dokuları Hematoksilin-Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Deneme grubu baş böbreği dokusunda interstitial dokunun hiperkromatik görünüm aldığı belirlenmiştir. İnterrenal hücrelerde belirgin hipertrofi ve vakuolizasyon izlenmiş, renal tübül epitel hücrelerinin normal yuvarlak şekillerini kaybedip düzensiz bir yapı sergilediği gözlenmiştir. Nekrotik epitel hücrelerinde karyolitik ve karyoretik nükleusların bulunduğu görülmüştür. Bulgular doğrultusunda baş böbreği dokusundaki hematopoetik ve immün sistem elemanları, ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruziyetinden önemli ölçüde etkilendiği görülmüştür. Ülkemizde boğazların çok özel konumu dikkate alındığında risk faktörleri bağlamında biyolojik sistemlerin etkilenme süreçleriyle ilgili bilgi birikiminin mutlaka artırılması gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ham petrol, *Xiphophorus hellerii*, Baş böbreği, Histopatoloji.

The Effects of Water Soluble Fractions of Crude Oil on the Head Kidney of *Xiphophorus hellerii* (Heckel, 1848; Poeciliidae, Teleostei)

Abstract: Crude oil that is used in many different areas causes pollution in the whole process from extraction to final users and in all environmental phases. Although there is information about the crude oil adversely affected the hematopoiesis, it is not clear whether there is the effect on the blood making processes of teleosts. In this study, it was aimed to reveal the acute effects of water soluble fractions of crude oil on head kidney, which is one of tissues forming blood-cells, in *Xiphophorus hellerii* (swordtails). After the adaptation period of two weeks, 20 adult *X. hellerii* samples (weight: 3 ± 0.5 g, length: 6 ± 1 cm) obtained from traders, divided into two groups that each group includes ten fish. No application was done to the control group. The test group samples were exposed to 40% concentration of water soluble fractions of crude oil for 96 hours. After this period, the tissues of obtained from the samples of control and test groups which were anesthetized MS 222, were examined after stained with Hematoxylin-Eosin, by light microscopy. It was determined that the interstitial tissue got hyperchromatic appearance at the head kidney tissue of test group. Marked hypertrophy and vacuolization were monitored at interrenal cells; it was observed that renal tubular epithelial cells lose their normal round shapes and exhibit an irregular structure. It was determined that the presence of karyolitic and karyorrhectic nuclei in necrotic epithelial cells. According to results, it was seen that hematopoietic and immune system components in the head kidney tissue were affected from exposition to water soluble fraction of crude oil. Considering the very special position of Bosphorus and Dardanelles Strait at our country, in the context of risk factors, fund of knowledge about exposure processes of biological systems is believed enhancing needed.

Keywords: Crude oil, *Xiphophorus hellerii*, Head kidney, Histopathology.

e-mail: onenozlem@gmail.com

Giriş

Ham petrol; heterosiklik bileşikler, fenoller, nitrojen ya da sülfür içeren polisiklik aromatik hidrokarbonlardan oluşmaktadır (Igwe ve Ukaogo, 2015). Farklı uzunluklardaki hidrokarbon zincirleri petrolün arıtımı sürecinde damıtma sayesinde ayrıştırılmakta ve benzin, kerosen gibi farklı ürünler elde edilmektedir. Plastik yapımında da hammadde olarak kullanılan ham petrol ve elde edilen petrol ürünleri, modern insan hayatına pratik kolaylıklar getirmekle beraber karmaşık organik yapısıyla da çevrede büyük ölçüde hasarlara neden olmaktadır (Chem 1010). Bilhassa antropojenik ve doğal kaynaklar aracılığı ile petrolün sulara karışması (Stout ve Wang, 2010) ekosistem için önemli bir risk faktörü teşkil etmektedir (Wang et al., 2006). Bu antropojenik kaynakların başında kazaların neden olduğu petrol sızıntıları ve kasıtlı operasyonel deşarjlar gelmektedir. Kazaların yol açtığı petrol sızıntılarının birincil kaynağını ham petrol ve petrol ürünlerini taşıyan tankerler oluştururken bunu kıyı tesislerinde ve denizlerde petrol üretimi yapan platformlar ve transportunda rol oynayan petrol boru hatları takip etmektedir (Stout ve Wang, 2010). Yayılan petrolün kompozisyonu ve dağılımı, türler ve doğa üzerindeki olası etkilerini belirlemektedir (Wang et al., 2006). Bu sebeplerle çevreye yayılan ham petrolün

suda çözünebilen kısımlarında bulunan toksik hidrokarbonlara maruz kalan sucul organizmalar toksikokinetik ve toksikodinamik süreçlerde önemli ölçüde etkilenmektedirler. Bu tip organik kirleticiler sucul organizmalar arasında farklı habitatlarda çok yaygın dağılım gösteren balıklarda kalıcı olup, balıkçılığın yaygın olduğu sularla çevrili alanlarda insanlar tarafından tüketildiği takdirde uzun vadede kansere yol açabilecek olumsuz sonuçlar doğurabilmektedir (lit balık sıçan ya da karaciğer solungaç balık insan)

Petrolün ekosistem üzerindeki uzun vadeli toksik etkilerine dair bilgiler bu denli genişken akut toksisitesi hakkındaki veriler sınırlıdır (Boyd et al., 2001; Wang et al., 2006; Nardocci et al., 2014; Tjeerdema et al., 2014). Bu bağlamda çok geniş kullanım alanına sahip ham petrolün biyolojik etkilerine ilişkin bilgileri artırabilmek için *Xiphophorus helleri* örneklerinin baş böbreği dokusunda ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının toksik etkilerinin ortaya konması amaçlandı.

Materyal ve Metot

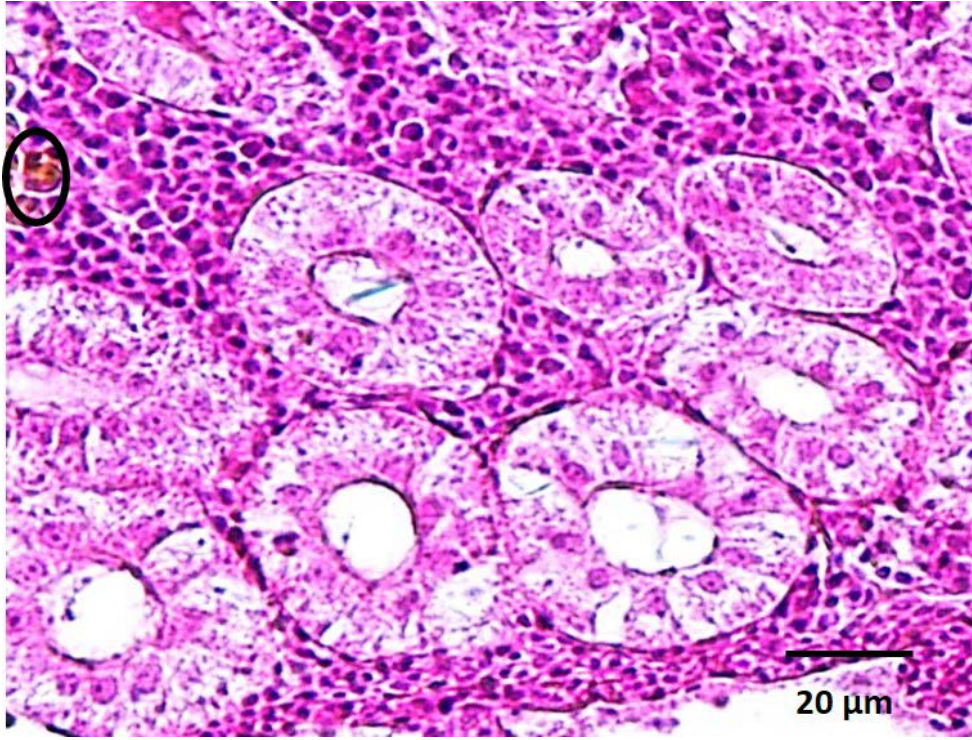
Bu çalışma, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları için Etik Kurul Kararlarına göre ve E.Ü.Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütüldü.

Ticari akvaryumculardan temin edilen aynı gelişim düzeylerindeki *Xiphophorus helleri* örnekleri, 10'ar balıktan oluşan kontrol ve uygulama grubuna ayrıldı. Alışma süresi olan iki hafta için 20'şer litrelik akvaryumlarda $26\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıktaki dinlendirilmiş Bornova şehir suyuna alınan balıklar doğal fotoperiyotta tutularak ticari balık yemleriyle beslendi. Ham petrol materyali İzmir Tüpraş Rafinerisinden temin edildi. Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarını elde edebilmek için ham petrol: şehir suyu=1:9 olmak üzere hazırlanan karışım 24 saat süreyle manyetik karıştırıcı ile karıştırıldıktan sonra 12 saat süreyle ayırma hunisinde bekletildi. Altta kalan sıvı kısımdan hazırlanan %40 oranındaki fraksiyonlar deneme grubunun suyuna eklenerek uygulandı. 96 saatlik süre sonunda her bir grubun örnekleri MS222 uygulanarak bayıltıldı ve baş kısmı dissekte edilerek rutin yöntemlerle alınan kesitler Hematoksilen-Eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX-51) ile incelenerek fotoğrafları çekilip kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

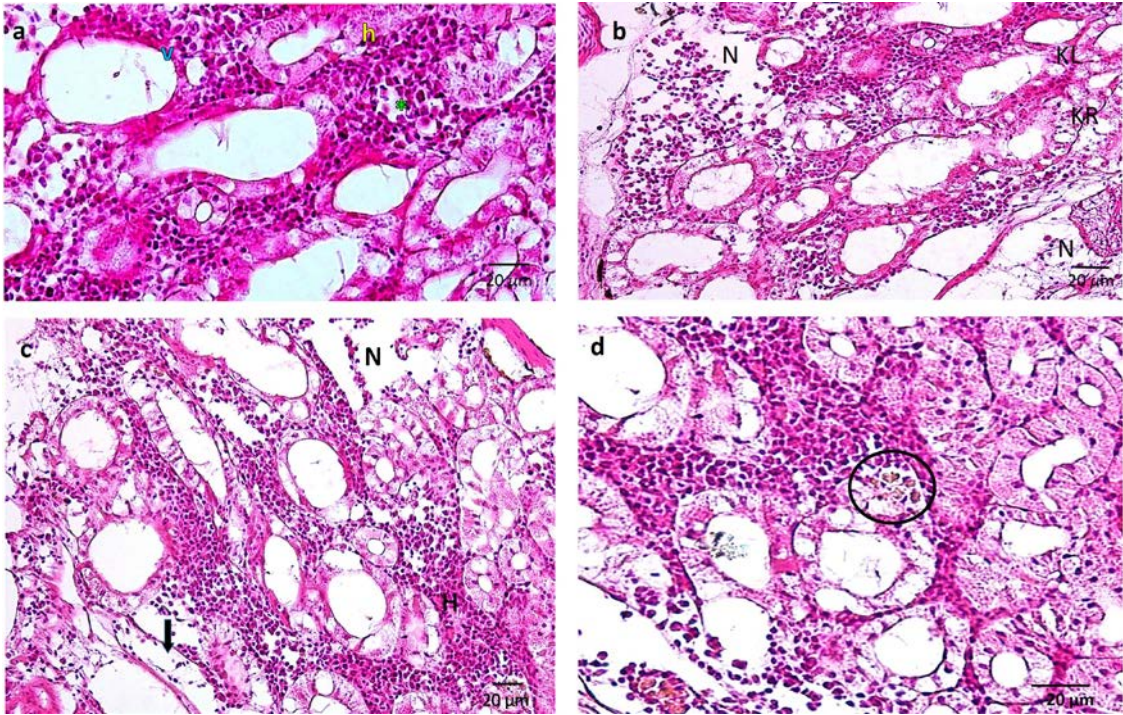
Bulgular

Kontrol ve deneme gruplarında hiçbir ölüm vakası olmadı ve örneklerde herhangi bir fiziki deformasyon ve davranış değişikliği gözlenmedi.

Teleostlarda vertebra ile yakın ilişkide olan ve vücut boşluğunun dorsalinde, posterior böbreğin uzantısı şeklinde bulunan baş böbreği morfolojik olarak yüksek omurgalılarıdaki kemik iliğine benzemektedir. Kontrol grubuna ait *X. helleri* örneklerinde de görüldüğü üzere baş böbreği dokusu hematopoetik doku içerisine gömülü renal tübüllerden ve eritropoetik ve granülopoetik serilerin, lenfositlerin ve fagositlerin yer aldığı interrenal alandan oluşmaktadır. Renal tübüller düzgün daire ve elipsoid yapılarını çevreleyen kapsülleri ve iri nükleuslu açık renkli, sınırları belirgin epitel hücreleriyle çok kolay ayırt edilebilmektedir. İnterrenal alanda düzensiz yığınlar oluşturan lenfoid elemanlar oldukça koyu boyalıdır. Ayrıca çok az sayıda melanomakrofaj merkezleri bulunmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Kontrol grubu baş böbreği dokusunda renal tübüller (RT), interrenal alan (IR) ve melanomakrofaj merkezi (daire içerisinde) (HE).



Şekil 2. Uygulama grubu baş böbreği dokusu; (a) h: hiperkromazi, v: vakuolizasyon, *:lenfoid elemanlarda hipertrofi; (b) KR: karyoretik nukleus, KL: karyolitik nukleus, N: nekroz ; (c) H: hiperkromazi, ok: tübüller atrofi, N: nekroz; (d) daire: melanomakrofaj merkezi (HE).

Deneme grubunda tübül epitel hücre sınırları genellikle ayırt edilememekte, bazı tübüllerde nukleuslar dahi gözlenemekte, yer yer atrofik tübüllere rastlanmaktadır. İnterrenal alanların hiperkromatik görünüm aldığı belirlenmiş, vakuolizasyona ilave olarak bazı lenfoid elemanlarda hipertrofi görülmüştür (Şekil 2a). Çok büyük deformasyon izlenen renal tübüllerin nekrotik epitel hücrelerinde karyolitik ve karyoretik nukleuslar gözlenmiştir. Ayrıca interrenal alanlarda çarpıcı genişlikte nekroz söz konusudur (Şekil 2b, c). Tübül epitel hücre sınırları genellikle ayırt edilememekte, bazı tübüllerde nukleuslar dahi gözlenememekte, yer yer atrofik tübüllere rastlanmaktadır (Şekil 2c). Renal tübüllerdeki çarpıcı dejenerasyon ilginç bir bölgeleşme göstermektedir. Yaygın biçimde bozunma izlenen tübüllerin gruplandığı alanın hemen yanında oldukça düzgün şekillerini halen koruyan tübüller yer alabilmektedir. İnterrenal alanları ilk gruba oranla çok daha dardır. Melanomakrofaj merkezlerinde ise herhangi bir değişim izlenmemiştir (Şekil 2d).

Tartışma ve Sonuç

Baş böbreği, Hematopoetik-İmmün-Endokrin/Nöroendokrin interaksiyonlar bağlamında işlevleri ancak son yıllarda tartışmaya açılan ilginç bir yapıdır. Baş böbreği üzerine çeşitli toksik kimyasalların

etkisi sınırlı sayıdaki araştırmada (Brand et al., 2001; Mela et al., 2007; Ghosh et al., 2007; Abdel-Aziz et al., 2009) rapor edilmiştir.

Farklı çalışmalardan elde edilen verilerle *Xiphophorus helleri* baş böbrek dokuları arasında gözlenen farklılıklar, bu yapıların daha fazla teleost türünde ortaya konması gerektiğine işaret etmektedir (Brand et al., 2001; Ghosh et al., 2007; Abdel-Aziz et al., 2009; Kondera et al., 2014).

Gözlemlerimiz, *X. helleri*' de daha düzenli ve belki de daha gelişmiş organizasyonu ile baş böbreğinin, toksik uygulamalar için daha elverişli bir yapılaşma gösterdiğini düşündürmektedir.

Sucul organizmalar arasında önemli bir yer tutan balıklar biyodenemelerde olduğu kadar toksikolojik çalışmalar için de uygun organizmalardır ve balık sağlığında meydana gelen histolojik, biyokimyasal değişiklikler çevre kirliliğinin biyobelirteçleri olarak nitelendirilebilmektedirler. Nitekim immün sistem elemanları kirleticilere maruziyetin değerlendirilmesinde etkili olmaktadır. Bu bağlamda baş böbreği, hematopoietik işlevleriyle düzenleyici bir role sahipken nöroimmünoendokrin bağlantıları ile bağışıklık ve endokrin etkileşimlerde merkezi bir organ olması bakımından önemlidir (Tort et al., 2003).

Baş böbreği üzerine çeşitli toksik kimyasalların histopatolojik etkisi sınırlı sayıdaki araştırmada (Brand et al., 2001; Mela et al., 2007; Ghosh et al., 2007; Abdel-Aziz et al., 2009; Kondera et al., 2014) rapor edilmektedir. Uygulama grubunda interrenal hücrelerde gözlenen vakuolizasyon, yaygın ve geniş nekroz bu bağlamda sunulan çalışmalarla uygunluk göstermektedir. Petrolün yan ürünlerini oluşturan vanadyumun hematopoetik süreçleri etkilediği, benzenin ve metabolitlerinin kemik iliği üzerinde ilk aşamada eritrosit oluşumunu inhibe ettiği ve insanlarda kanserojenik olduğu bilinmektedir (Vural, 2005). Bu açıdan kan hücrelerinin yapım süreçlerinin gerçekleştiği bu bölgede ciddi ölçüde hasar olduğu görülmekte ve canlının genel sağlığının olumsuz etkilendiği düşünülmektedir. Dokuda çarpıcı şekilde gözlenen nekrotik alanlar ayrıca fagositik aktivitenin arttığına da işaret etmektedir (Ghosh et al., 2007; Kondera et al., 2014). Hem kontrol hem de uygulama grubunda interrenal alanda yığınlar halinde, inklüzyonlar içeren geniş hücreler olarak melanomakrofajlar yer almaktadır. Karaciğerde, dalakta, baş böbreğinde bulunan melanomakrofajların sayısı, boyut ve şekillerindeki değişiklikler ekotoksikantlara karşı birer immün cevap niteliğindedir (Tort et al., 2003; Rabitto et al., 2005; Suresh, 2009; Uribe, 2011). Örneğin organoklorinli

ve karbamat grubundan pestisitlerin uygulandığı gökkuşacağı alabalıklarının (*Oncorhynchus mykiss*) (Boran et al., 2010; Banaee, 2013; Banaee et al., 2013) böbrek, dalak ve baş böbreği dokularında melanomakrofaj artışı olduğu bildirilmekte ve *Onchorhynchus gorbuscha* (Brand et al., 2001) karaciğerlerinde gözlenen melanomakrofaj artışının sucul ortam kirliliğinin en önemli belirteçlerinden biri olduğu not edilmektedir. *Hoplias malabaricus* üzerine yapılan bir araştırmada ise baş böbreği dokusunda melanomakrofaj merkezlerinin sayısında hem artış hem de azalma tespit edilmiştir. Görülen bu çelişkili durum melanomakrofajların kökeni ve rolü tam olarak aydınlatılmadığından net değerlendirilememiştir (Rabitto et al., 2005). *Xiphophorus hellerii* üzerine yaptığımız bu uygulama sonucunda da melanomakrofaj merkezlerinde herhangi bir değişim gözlenmemektedir. Bu da bize balık türümüzün biyodenemeler için uygun bir tür olarak seçildiğini düşündürmekle birlikte ayrıca ve mutlaka immünohistokimyasal yöntemlerle de çalışılması gerektiğini işaret etmektedir.

Uygulama grubunda dikkati çeken değişimlerden biri de renal tübüllerde meydana gelen deformasyondur. Tübül hücre nükleuslarında nekroza bağlı olarak izlenen karyolizis ve karyoreksi, toksik madde

uygulamalarında karşılaşılan genel histopatolojik bulgulardandır (Rubela et al., 2008; Tekkan Kolbaşı et al., 2009).

Uygulama grubunda renal tübüllerde izlenen dejenerasyonun bölgeleşme göstermesi çalışma materyalimizde ham petrolün suda çözünebilen parçacıklarından etkilenme sürecinin de, az önce sunulan çalışmada kullandığımız materyalden büyük olasılıkla

farklı olduğunu akla getirmektedir. Melanomakrofaj merkezlerinde uygulama sonucunda herhangi bir fark izlenmemesi ayrıca ve immünohistokimyasal yöntemlerle çalışılması gerektiğini işaret etmektedir. Farklı ve daha ileri tekniklerin uygulanmasıyla alt omurgalı gruplarında toksikokinetik ve toksikodinamik süreçlerin bağışıklık sistemiyle olan ilişkileri daha iyi anlaşılabilir.

Kaynaklar

Abdel-Aziz E-SH, Abdu SBS,2 Ali TE-S, Fouad HF 2009. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study. *Fish Physiol Biochem*, 36(3): 323–336.

Banaee M, Sureda A, Mirvagefi AR, Ahmadi K 2013. Histopathological Alterations Induced by Diazinon in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Environmental Research*, 7(3):735-744.

Banaee M, 2013. Physiological Dysfunction in Fish After Insecticides Exposure. *InTech*, s103-143. <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/42228.pdf>.

Boran H, Altinok I, Capkin E. 2010. Histopathological Changes Induced by Maneb and Carbaryl on Some Tissues of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue Cell*, 42(3): 158-64.

Boyd JN, Kucklick JH, Scholz DK, Walker AH, Pond RG, Bostro A 2001. Effects of Oil and Chemically Dispersed Oil In The Environment. Health and Environmental Sciences Department API Publication Number 4693 Prepared Under Contract By: J.N. Boyd, J.H. Kucklick, D.K. Scholz, A.H. Walker, R.G. Pond, and A. Bostrom Scientific and Environmental Associates, Inc. Cape Charles, Virginia. 1220 L Street, Northwest Washington, D.C. 20005-4070, 202-682-8000, 50s.

Brand DG, Fink R, Benguefield W, Birtwell IK, Mcallister CD 2001. Salt Water-Acclimated Pink Salmon Fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) Develop Stress-Related Visceral Lesions after 10-Day Exposure to Sublethal Concentrations of the Water-Soluble Fraction of North Slope Crude Oil. *Toxicologic Pathology*, 29(5): 574–584.

Chem 2011. Organic Hydrocarbons: Compounds made from carbon and hydrogen. Lecture Notes https://web.archive.org/web/20110719184614/http://cactus.dixie.edu/smlblack/chem1010/lecture_notes/2B.htm (Erişim tarihi: 19 Temmuz 2011).

Ghosh D, Datta S, Bhattacharya S, Mazumder S 2007. Long-term exposure to arsenic affects head kidney and impairs humoral immune responses of *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology*, 81:79–89.

Igwe JC, Ukaogo PO 2015. Environmental Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Journal of Natural Sciences Research*, 5(7): 117-132. ISSN: 2224-3186 (Paper), ISSN: 2225-0921 (Online).

Kondera E, Ługowska K, Sarnowski P 2014. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(1): 9-22. Published online 2013 Jun 12.

Mela M, Randia MAF, Ventura DF, Carvalho CEV, Pelletier E, Oliveira Ribeiro CA 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 426–435.

Nardocci G, Cristina N, Cortes PP, Imirai M, Montoya M, Valenzuela B, Jarab P, Acuna-Castillo C 2014. Neuroendocrine mechanisms for immune system regulation during stress in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 40: 531-538.

Rabitto IS, Alves Costa JRM, Silva de Assis HC, Pelletier E', Akaishi FM, A. Anjos A, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA 2005. Effects of Dietary Pb(II) and Tributyltin on Neotropical Fish, *Hoplias malabaricus*: Histopathological and Biochemical Findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(2):147-56.

Rubela S, Pandey AK, Khare AK 2008. Histopathological manifestations in kidney of *Clarias batrachus* induced by experimental *Procammallanus* infection. *Journal of Environmental Biology*. 29(5) 739-742.

Stout AS, Wang Z 2010. Chemical Fingerprinting of Spilled or Discharged Petroleum – Methods and Factors and Affecting Petroleum Fingerprints in the Environment. Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification. Academic Press, 26 Tem 2010 - 620 sf.

Suresh N 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology*, 30(4): 505-508.

Kolbaşı Tekkan B, İşisağ Üçüncü S, Önen Ö 2009. The effects of sodium perchlorate on the liver of Molly Fish (*Poecilia sphenops*, Cyprinidae, Teleostei). *African Journal of Biotechnology*, 8(11): 2640-2644.

Tjeerdema R, Bejarano AC, Edge S 2014. Biological Effects of Dispersants and Dispersed Oil on Surface and Deep Ocean Species. s1-s19. <https://crrc.unh.edu/sites/crrc.unh.edu/files/tjeerdemabejaranoedge.pdf> (Erişim tarihi: 18.12.2014)

Tort L, Balasch JC, Mackenzie S 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Inmunología*, 22(3): 277-286.

Uribe C, Folch H, Enriquez R, Moran G 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 56(10): 486–503.

Vural N 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Yayınları No: 73, 659s, ISBN: 975-482-289-1.

Wang Z, Stout AS, Fingas M 2006. Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification. Forensic Fingerprinting of Biomarkers for Oil Spill Characterization and Source Identification, *Environmental Forensics*, 7:2, 105-146.