

Ham Petrolün Suda Çözünebilen Kısımlarının *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Poeciliidae, Teleostei) Testis Histolojisi Üzerindeki Etkileri

Özlem ÖNEN^{1,*}, Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ²

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

² Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İzmir

8-6A

Özet: Bu çalışmada, ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının *Xiphophorus helleri* (kılıçkuyruk) testis dokusundaki akut etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Kırk adet ergin erkek *X. helleri* örneği (ağırlık: 3±0,5 gr, uzunluk: 6±1 cm) her biri onar balıktan oluşan üç deneme bir kontrol grubu olmak üzere toplam dört gruba ayrılmış, deneme grupları %10, %20, %40 konsantrasyonlarda ve 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılmıştır. MS 222 ile uyuşturulan kontrol ve deneme grubu örneklerinden alınan testis dokuları Hematoksilen-Eozin ile boyanarak ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Konsantrasyon ve maruziyet süresi artışına paralel olarak tüm deneme gruplarının testis dokusunda yaygın hemoraji ve vazodilatasyon, semifer tübüllerde küçülme, Leydig hücrelerinde piknozis ve nekrozis, germinal epitel hücrelerinde düzensizleşme izlenmiştir. Bulgular, özellikle nakliye sırasında gösterilmesi gereken çok büyük özene rağmen oluşabilecek petrol kazalarından sonra, sucul omurgalıların üreme başarıları ile populasyon dinamiklerinin dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

Anahtar kelimeler: Ham petrol, *Xiphophorus helleri*, Testis, Gonad, Histopatoloji.

The Effects of Water Soluble Fraction of Crude Oil on The Testis Histology of *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Poeciliidae, Teleostei)

Abstract: The subchronic effects of water-soluble fractions of crude oil on testicular tissue of *Xiphophorus helleri* (kılıçkuyruk) was intended to reveal in this study. Forty adult male *X. helleri* (weight: 3±0,5 gr, length: 6±1 cm) were separated four groups that includes three experiment groups and one control group; the experiment groups were exposed 24, 48, 72, 96 hours and 10%, 20%, 40% concentrations of water soluble part of crude oil. Animals anesthetized by MS 222; the testicular tissue dissected from control and experiment groups stained with Hematoxylin-Eosin and investigated by light microscopy. Parallel to the increasing of concentration and exposure time, widespread hemorrhage and vasodilation in testicular tissue, contraction of seminiferous tubules, picnosis and necrosis in Leydig cells, disorganization in germinal epithelium cells was viewed of all experiment groups. After oil spill despite the great care should be shown, especially during transport, our results indicated that the reproductive success and population dynamics of aquatic vertebrates should be evaluated carefully.

Keywords: Crude oil, *Xiphophorus helleri*, Testis, Gonad, Histopathology.

*(Corresponding author) e-mail: onenozlem@gmail.com

Giriş

Yoğun insan aktivitelerinin deniz ve kıyı ekosistemleri üzerinde ciddi tahribat oluşturma riski her geçen gün artmaktadır. Açık deniz platformlarındaki üretim tesislerinden ve özellikle de nakliye süreçlerindeki yayılımlardan kaynaklanan ham petrol kirliliği hem açık denizleri kirletir, hem de önemli yumurtlama ve kuluçkalama alanları olan nehir ağızları ve kıyısız bölgelere ulaşarak buralardaki yaşamı olumsuz etkiler (Ramachandran et al., 2006; Greer, 2011). Yakın geçmişte Exxon Valdez, Amoco Cadiz ve Cosco Busan tanker kazaları gibi çok çarpıcı örneklerden de hatırlanacağı üzere, ham petrol kıyısız kesimler için olağanüstü zarar vericidir (Marty et al., 2003; Incardona et al., 2011). 2010 Nisan ayında Meksika Körfezinde oluşan ve her gün okyanusa binlerce varil ham petrol karışmasına neden olan petrol platformu kazası, bu olağanüstü boyutların nerelere ulaşabileceğinin en yakın örneğidir (Kastan, 2010).

Ham petrolün suda çözünebilen kısımları çok uçucu ve toksik özellikler taşıyan hidrokarbonlar içerir. Bu maddeler sucul omurgalıların üreme başarılarını ciddi ölçüde olumsuz etkileyebilirler (Johnson et al, 1993). Bu noktalardan hareketle dişi ve erkek *Xiphophorus helleri* (kılıçkuyruk) örneklerinde ham petrolden kaynaklanan

üreme sorunlarının belirlenebilmesi için planlanan çalışmaların ilk ayağında, ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruziyetin testisler üzerindeki subkronik etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmamız Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca (EÜHADYEK Sertifika No: 000018) yürütülmüştür. Ticari akvaryumculardan temin edilen kırk adet ergin erkek *X. helleri* örneği (ağırlık $2.85 \pm 0,5$ gr; boy 6 ± 1 cm) dinlendirilmiş şebeke suyu ile doldurulan onar litrelik cam akvaryumlarda 15 gün boyunca laboratuvar ortamına alıştırmıştır. Onar balıktan oluşan üç deneme ile bir kontrol grubu ayrılmış, deneme grupları %10, %20, %40 konsantrasyonlarda ve 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılmıştır. MS 222 uygulanarak uyuşturulan kontrol ve deneme grubu örneklerinden alınan testis dokuları rutin preparasyon işlemlerinden geçirilip, Hematoksilen-Eozin ile boyanan 4-6 µm kalınlığındaki kesitler ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

Bulgular

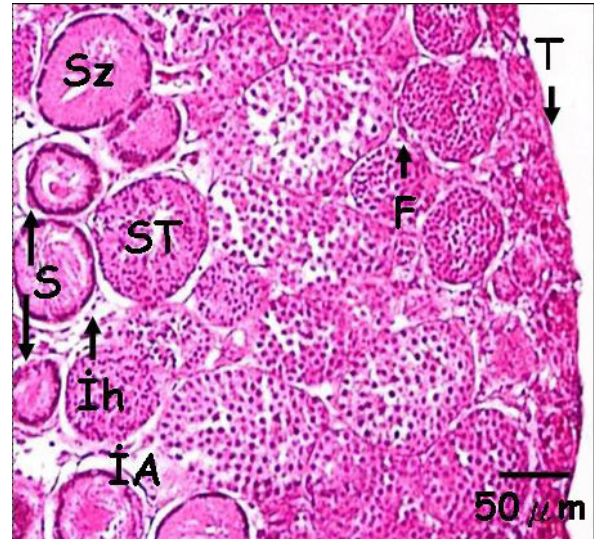
Kontrol Grubu

Xiphophorus helleri' de testis parankiması bağ dokudan oluşan bir kapsülle, tunika albuginea ile çevrilidir. Parankima interstitial alanda gömülü kistler halindeki seminifer tübüllerden oluşur. İnterstisyial alan fibroblastlar ve kollajen fibril bakımından zengin bağ dokusu içerisinde erkek eşey hormonunu üreten interstisyial hücreler içerir. İnce bir epitelle çevrili seminifer tübüllerde periferde yakın biçimde primer ve sekonder spermatogoniumlar ve bunlar arasında olup spermatogenez hücreleri destekleme, koruma, geliştirmekte olan spermatozoonları besleme ve spermatozoon oluşumu sırasında arta kalan sitoplazmik parçacıkları fagosite etme gibi işlevleri olan sertoli hücreleri ile primer ve sekonder spermatosit, spermatid ve olgun spermatozoonlar yer alır. Yassı görünümüne sertoli hücreleri spermatozeugmata adı verilen ve spermatozoonları taşıyan seminifer tübüllerinin periferinde sayıca artış gösterir (Şekil 1).

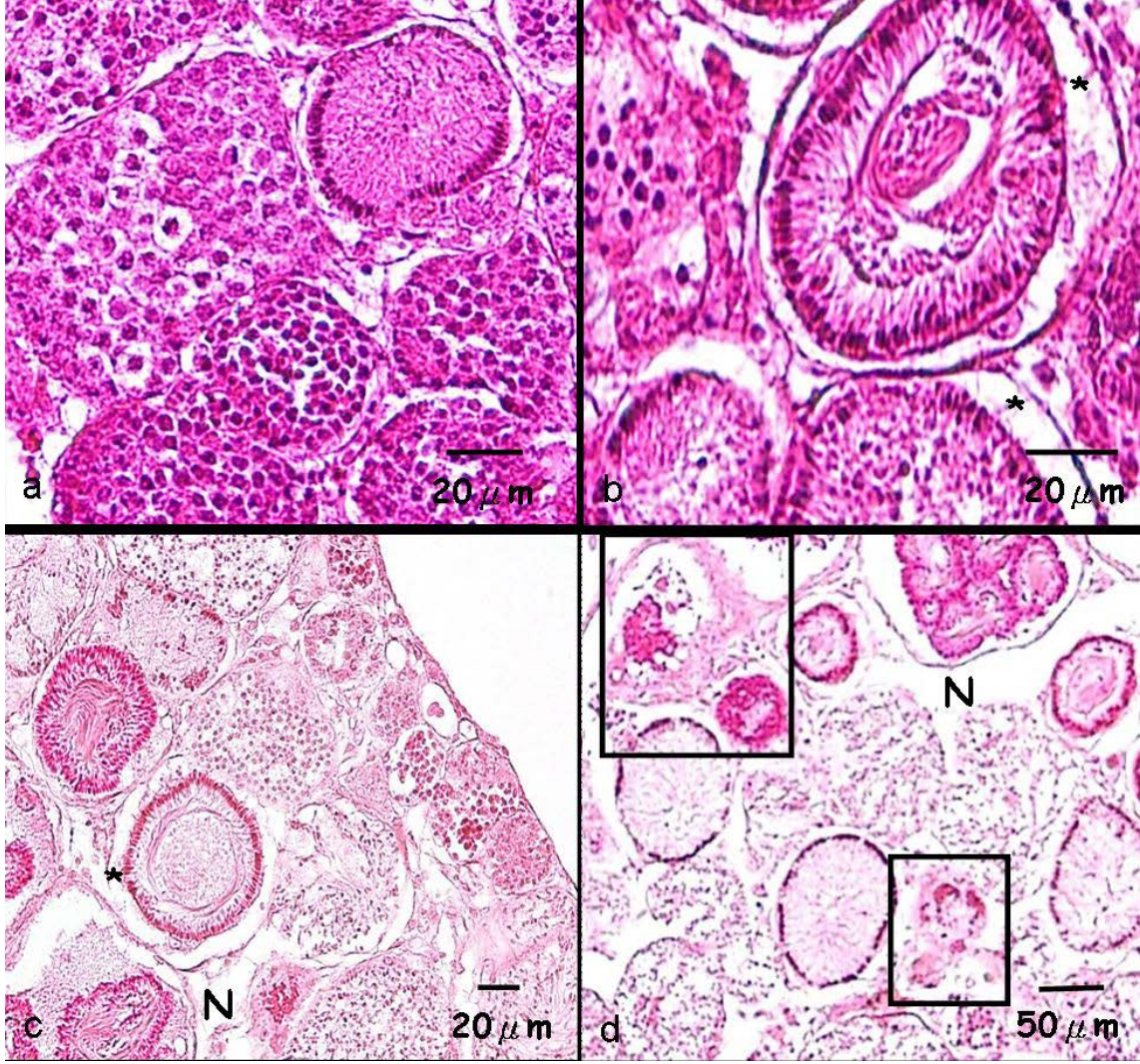
%10 Deneme Grubu

10'luk çözelti uygulanan grupta 24 saat sonunda kontrol grubuna göre farklılık gözlenmemiştir (Şekil 2.a). Aynı

konsantrasyonda 48 saatlik deneme sonunda seminifer tübüllerin çevresindeki epitel tabakası yer yer tübüllerden ayrılmış haldedir (Şekil 2.b). 72 saatlik deneme sonunda bazı seminifer tübüller belirgin olarak bozulmuş haldedir, epitel tabakası ile tübüller arasındaki boşluklar daha da genişlemiştir, interstisyial alanda da çok geniş boşluklar halinde nekroz izlenmektedir (Şekil 2.c). 96 saat deneme sonunda doku genelinde bütünlük büyük ölçüde bozulmuştur, interstisyial alanda yaygın ve çok geniş nekrotik bölgeler vardır, ayrıca yer yer atrofik tübüllere de rastlanmaktadır (Şekil 2.d).



Şekil 1. Kontrol grubunda testis genel yapısı. Tunika albuginea (T), interstisyial alan (İA), interstisyial hücreler (İh), fibroblastlar (F), sertoli hücreleri (S), spermatozeugmata (Sz), seminifer tübüleri (ST).



Şekil 2.a. %10 konsantrasyon 24 saat; **b.** %10 konsantrasyon 48 saat, seminifer tübüllerin çevresindeki epitel tabakası ile tübüllerde ayrılma (*); **c.** %10 konsantrasyon 72 saat, seminifer tübüllerin çevresindeki epitel tabakası ile tübüllerde ayrılma (*), nekrotik alanlar (N); **d.** %10 konsantrasyon 96 saat, nekrotik alanlar (N), atrofik tübüller (dikdörtgen içerisinde).

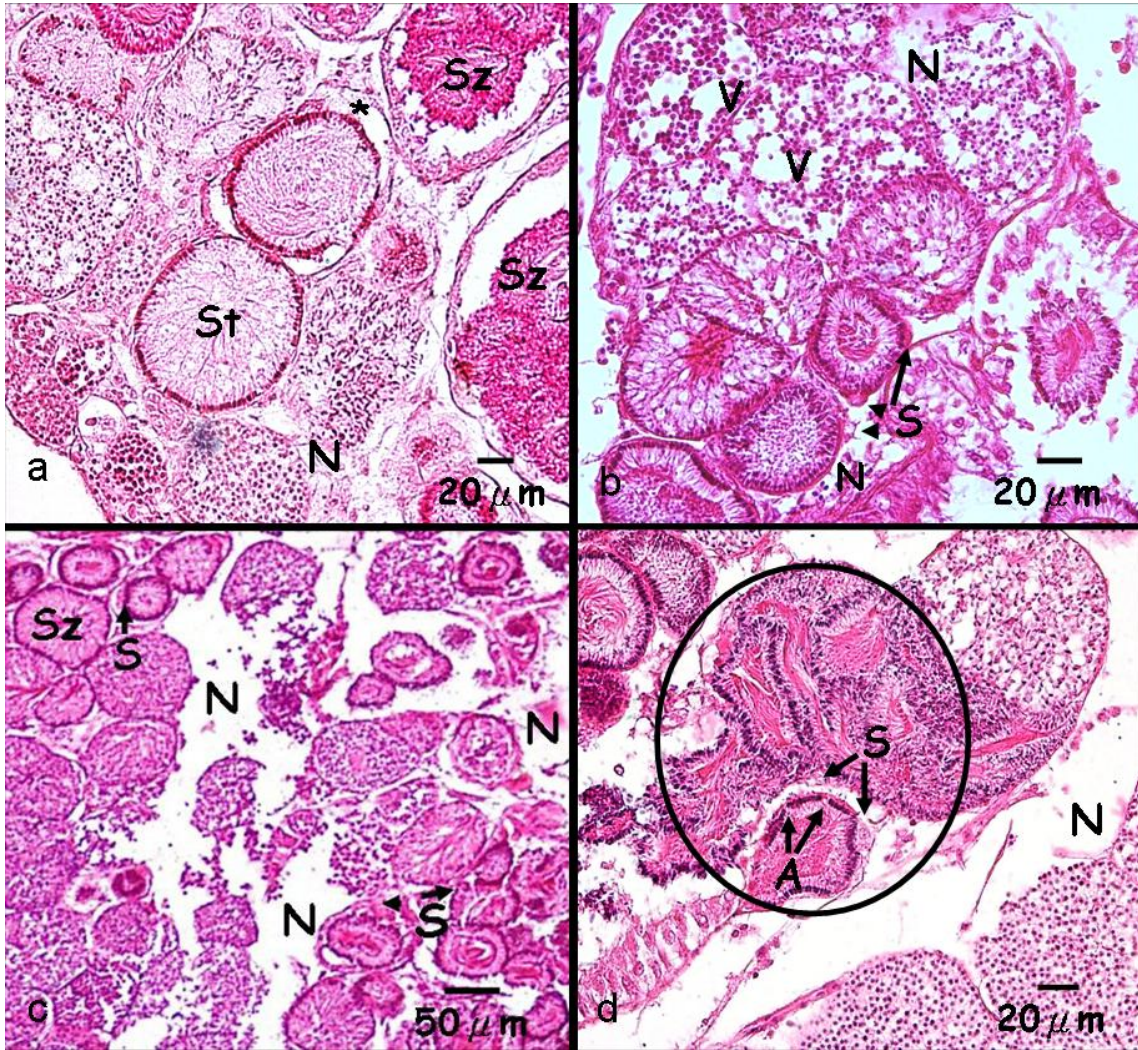
%20 Deneme Grubu

% 20 konsantrasyonluk denemede 24 saat sonunda interstisiyal alanda nekrozun devam ettiği, tübül epitelindeki ayrılmanın arttığı, spermatozid içeren seminifer tübüllerde vakuoler görünümle belirlenen bozulmalara oranla, gruplar oluşturan ve spermatozeugmataların daha fazla etkilendikleri izlenmiştir, ayrıca bu tübüllerin

merkezinde birikimler vardır. 48 saatlik denemede interstisiyal alandaki nekrotik alanlar ve seminifer tübüllerdeki vakuoller, artan deneme süresi paralelinde önemli ölçüde genişlemiştir. Tübül merkezlerindeki birikim yoğunlaşarak artmıştır. Deforme tübüllerde hipertrofik sertoli hücreleri gözlenmektedir. 72 saat sonunda nekrotik alanlar çok geniştir, seminifer tübüller

içerisinde vakuoller oluştuğu ve deforme olmuş spermatozoonları içeren spermatozeugmata periferinde sertoli hücrelerinin sayısının ve büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir. 96 saat süre sonrasında testis parankimasında çok geniş nekrotik boşluklar gözlenmektedir. Yer yer genel görünümü bozulmuş Spermatozeugmata

kümelerine ek olarak spermatozeugmata periferinde spermatozoonların baş bölgelerinin oluşturduğu koyu boyanmış dış kısımlar yer yer parçalanarak ayrılmıştır. Sertoli hücrelerinin sayılarının ve büyüklüklerinin bir önceki güne göre arttığı görülmektedir.



Şekil 3.a. %20 konsantrasyon 24 saat, nekroz (N), seminifer tübüller (St), tübül çevresinde ayrılma (*), spermatozeugmata (Sz); **b.** %20 konsantrasyon 48 saat, interstitiyal alanda nekroz (N), seminifer tübüllerdeki vakuoller (V), deforme tübüllerde hipertrofik sertoli hücreleri (S); **c.** %20 konsantrasyon 72 saat, nekrotik alanlar (N), spermatozeugmata (Sz) periferinde sertoli hücreleri (S); **d.** %20 konsantrasyon 96 saat, nekrotik boşluklar (N), genel görünümü bozulmuş spermatozeugmata kümeleri (daire), spermatozeugmata periferinde ayrılmalar (A), sertoli hücreleri (S).

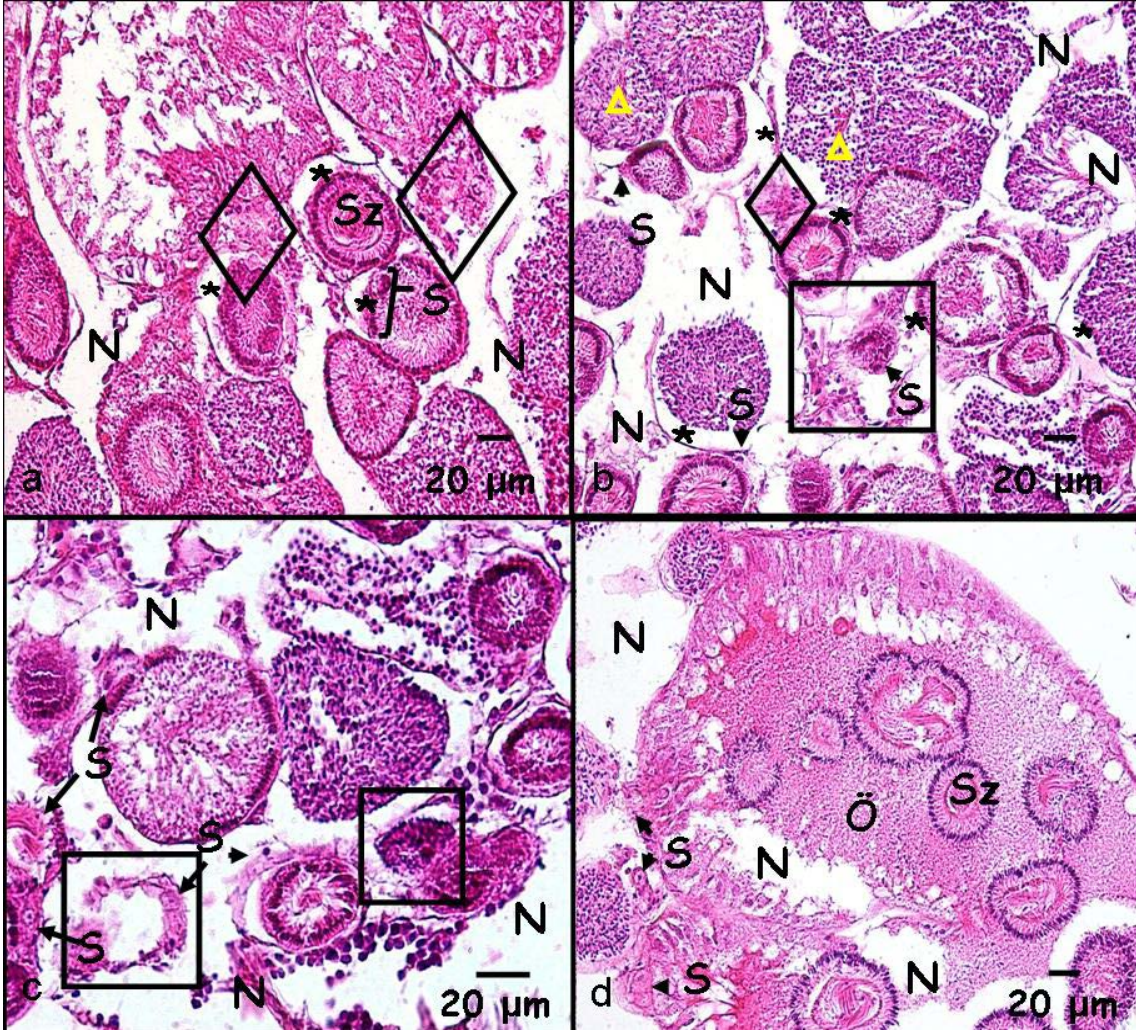
%40 Deneme Grubu

% 40 konsantrasyon 24 saatlik denemede interstisiyal alanda oldukça geniş nekroz sözkonusudur. Spermatozeugmata epitelinin ayrılması belirgindir. Nekrotik spermatozeugmata periferinde sertoli hücrelerinin sayısı ve büyüklüğünün arttığı ve yer yer kümelenme gösterdiği izlenmiştir. 48 saatlik deneme sonunda interstisiyal alanın çarpıcı nekrotik görünümünün yanısıra seminifer tübül epitelinde ayrılma ve az miktarda hemoraji görülmektedir. Devam eden spermatozeugmata atrofisi söz konusudur. Sertoli hücreleri deforme spermatozeugmataların çevresinde belirginleşmiş ve yer yer gruplar oluşturmuştur. 72 saatlik denemede gittikçe yaygınlaşan spermatozeugmata atrofisi söz konusudur ve spermatozeugmata etrafındaki sertoli hücreleri çok belirgin görülmektedir. Bir önceki güne göre genişlemiş nekrotik alanlar belirgindir. Maksimum konsantrasyon ve maksimum deneme süresi sonunda testis genelindeki nekroz ve spermatozeugmata atrofisi en üst düzeydedir. Atrofi nedeniyle tübül sayısında önemli ölçüde azalma vardır. Bazı kesitlerde yer yer izlenen ödem, diğer bazılarında çok geniş alanlara yayılmış haldedir. Sertoli hücrelerinin sayı ve büyüklüklerinin son derece arttığı görülmektedir.

Tartışma ve Sonuç

Balıkların üreme sağlığı çalışmalarında histolojik incelemeler güçlü bir araç olduğu ve üreme organlarının histolojik yapısının, kimyasallara özgü olmamakla birlikte kirliliğe duyarlı olduğu bilinmektedir (Blazer, 2002; Mohamed, 2008). Üreme organlarındaki değişiklikler ile kirlilik miktarları arasındaki bağlantılar, su ürünlerini tehdit eden kirlilik seviyelerinin belirlenmesinde önemlidir. Endokrin sistemi engelleyen kirleticilerin son yıllarda çektiği büyük ilgi, toksik kimyasalların teleost üreme sistemi üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaları da artırmıştır (Safe, 2000).

Özellikle ağır metallerin teleost üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerine yönelik birçok çalışma vardır, örneğin kadmiyumun eşeyssel olgunlaşmayı engellediği (Hatekeyama ve Yasuno, 1987), embriyo ve larva gelişimini yavaşlattığı (Levesque et al., 2002, Migliarini et al., 2005), hormon dengelerini değiştirdiği (Tilton et al., 2003) bilinmektedir. Sunulan çalışmada izlenen histopatoloji, özellikle yaygın nekroz oluşumu ve tübüler atrofi, testisin maruz kalınan kimyasala göre değişmeyen, özgül olmayan deformasyonuna dair bulgularla örtüşmektedir.



Şekil 4.a. %40 konsantrasyon 24 saat, nekroz (N), interstisiyal alanda nekroz (N), spermatogonia (Sz) epitelinde ayrılma (*), nekrotik spermatogonia periferinde sertoli hücreleri (S), kümelenmiş sertoli hücreleri (eşkenar dörtgen); **b.** %40 konsantrasyon 48 saat, interstisiyal alanda nekroz (N), seminifer tübül epitelinde ayrılma (*), hemoraji (kanlanma: Δ), spermatogonia atrofisi (kare), sertoli hücreleri (S), deforme spermatogonmaların çevresinde kümelenmiş sertoli hücreleri (eşkenar dörtgen); **c.** %40 konsantrasyon 72 saat, spermatogonia atrofisi (kare), spermatogonia etrafındaki sertoli hücreleri (S), genişlemiş nekrotik alanlar (N); **d.** %40 konsantrasyon 96 saat, nekrotik boşluklar (N), testis genelinde nekroz (N), spermatogonia (Sz) atrofisi, ödem (Ö), sayıca artmış sertoli hücreleri (S).

Bazı toksik maddelere maruziyette artan konsantrasyon ve süreye bağlı olarak testisin interstisiyal alanlarında hücre sayısının artışı ve ödem, testis salgı hücrelerinin biyokimyasal tepkisi olarak yorumlanmıştır (Wolf, 2005). Sunulan çalışmada %20 konsantrasyonda 72 saat, %40 konsantrasyonda ise 24 saat sonunda tübüllerde ve her iki konsantrasyonda da 96 saat sonunda interstisiyal alanda gözlenen vakuolizasyon, Wistar cinsi ratların seminifer tübüllerinde (Çolakoğlu ve ark., 2004) ve *Oreochromis niloticus* ve *Lates niloticus* türleriyle yapılan çalışmalarda da (Mohammed, 2008; Kumar et al., 2007) not edilmiştir. %20 konsantrasyondaki deneme grubunda 48 ve 72 saat sonunda tübüller içerisinde ve %40 konsantrasyondaki deneme grubunda 72 saat sonunda tübül içerisinde ve 96 saat sonunda da yaygın olarak interstisiyal alanda gözlenen yoğunlaşmış bölgeler

Çolakoğlu ve ark. (2004) tarafından solid madde birikimi şeklinde yorumlanmıştır. Sunulan çalışmada bu birikimlerin atrofik doku kalıntıları oldukları düşünülmektedir. Nekrotik spermatozeugmataların periferinde sertoli hücrelerinin sayı ve büyüklük bakımından artışı spermatozoon deformasyonu şeklinde yorumlanmıştır (Kinnberg ve Toft, 2003; Kinnberg et al, 2000).

Bulgularımız ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının, *X. helleri* testis dokusunu ciddi ölçüde olumsuz etkilediğini ortaya koymaktadır. Bu çalışma, özellikle nakliye sırasında gösterilmesi gereken çok büyük özene rağmen oluşabilecek petrol kazalarından sonra sucul omurgalıların üreme başarıları ile populasyon dinamiklerinin dikkatle değerlendirilmesinin gerekliliği bakımından temel oluşturacaktır.

Kaynaklar

Blazer VS, 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85–101.

Çolakoğlu N, Kükner A, Kara H, Ozan E, 2004. Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum Klorür'ün Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Metallothionein'in Etkileri: Işık Mikroskopik Çalışma. *Turkish Clinics J Medical Science*, 24, 201-206.

Greer CD, 2011. Toxicity of Chemically Dispersed Crude Oil to Herring Embryos. MSc Thesis, 1-24, Queen's University Kingston, Ontario, Canada.

Hatekeyama S, Yasuno M, 1987. Chronic effects of Cadmium on reproduction of the guppy (*Poecilia reticulata*) through Cd accumulated midge larvae (*Chironomus yoshimatusi*) *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 14(3): 191-207.

Incardona J, Ylitalo G, Myers M, Scholz N, Collier T, Vines C, Griffin F, Smith E, Cherr G, 2011. Field and laboratory assessment of toxic injury to Pacific herring embryos and larvae in the San Francisco estuary. The 2007 *Cosco Busan* oil spill, 6-18, Northwest Fisheries Science Center Environmental Conservation Division Ecotoxicology and Environmental Assessment Programs, 2725 Montlake Blvd E Seattle, WA 98112 and Departments of Environmental Toxicology, Environmental Science and Policy, and the Aquatic Resources Group Bodega Marine Laboratory University of California - Davis 2099 Westside Road Bodega Bay, CA 94923, USA.

Johnson L, Casillas E, Sol S, Collier T, Stein J, Varanasi U, 1993. Contaminant Effects on Reproductive Success in Selected Benthic Fish. *Marine Environmental Research*, 35(1-2): 165-170, 1993.

Kastan K, 2010. Meksika Körfezi ham petrole bulandı. <http://www.dw-world.de/dw/article/0,,5512795,00.html> (*Erişim tarihi: 27.04.2010*).

Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P, 2000. Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Marine Environmental Research*, 50, 169-173.

Kinnberg K, Toft G, 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 16–24.

Kumar M, Trivedi SP, Misra A, Sharma S, 2007. Histopathological Changes in Testis of The Freshwater Fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) Exposed to Linear Alkyl Benzene Sulphonate (LAS). *Journal of Environmental Biology*, 28(3): 679-684.

Levesque HM, Moon TW, Campbell PGC, Hontela A, 2002. Seasonal Variation in Carbohydrate and Lipid Metabolism of Yellow Perch (*Perca flavescens*) Chronically Exposed to Metals in the Field. *Aquatic Toxicology*, 60, 257-267.

Marty GD, Hoffmann A, Okihiro MS, Hepler K, Hanes D, 2003. Retrospective Analysis: Bile Hydrocarbons and Histopathology of Demersal Rockfish in Prince William Sound, Alaska, After the Exxon Valdez Oil Spill. *Marine Environmental Research*, 56, 569–584.

Migliarini B, Campisi AM, Maradonna F, Truzzi C, Annibaldi A, Scarponi G, Carnevali O, 2005. Effects of Cadmium Exposure on Testis Apoptosis in The Marine Teleost *Gobius niger*. *General and Comparative Endocrinology*, 142, 241–247.

Mohamed FAS, 2008. Bioaccumulation of Selected Metals and Histopathological Alterations in Tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from Lake Nasser, Egypt. *Global Veterinaria*, 2(4): 205-218.

Ramachandran SD, Swezey MJ, Hodson PV, Boudreau M, Courtenay SC, Lee K, King T, Dixon JA, 2006. Influence of Salinity and Fish Species on PAH Uptake from Dispersed Crude Oil. *Marine Pollution Bulletin* 52, 1182–1189.

Safe SH, 2000. Endocrine Disruptors and Human Health-Is There a Problem? An Update. *Environmental Health Perspectives*, 108(6): 487-493.

Tilton SC, Foran CM, Benson WH, 2003. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136(3): 265-276.

Wolf JC, 2005. EDMVAC Plenary Meeting. DVM, DACVP. Experimental Pathology Laboratories (EPL®), Washington, D.C., April 27.