

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTHALL'İN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
TESTIS DOKUSU ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK
ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep İŞEL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

Eylül 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOTHALL'İN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*)
TESTİS DOKUSU ÜZERİNE HİSTOPATOLOJİK
ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep İŞEL

Enstitü Anabilim Dalı

BİYOLOJİ

Bu tez 06.09.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr.
Hafize Sibel ÖZESEN
ÇOLAK
Jüri Başkanı



Doç. Dr.
Tuğba ONGUN
SEVİNDİK
Üye



Doç. Dr.
Nazan Deniz YÖN
ERTUĞ
Üye



BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Zeynep İŞEL

06.09.2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda bilgi ve desteğini almaktan çekinmediğim, her türlü desteği ve emeği veren değerli danışman hocam Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecim boyunca desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Arş. Gör. Cansu AKBULUT'a teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi ve manevi olarak bu süreçte yanımda olan en değerli varlıklarım babam Bekir İŞEL, annem Benal İŞEL, kardeşlerim Osman İŞEL ve Emre İŞEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tüm bu süreç boyunca maddi ve manevi destekçilerim kız kardeşim Büşra FIDAN'a, abilerim Özgür ÇELİK ve Semih GÜRTAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii

BÖLÜM 1.

GİRİŞ	1
-------------	---

BÖLÜM 2.

KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Zebra balığının genel özellikleri.....	3
2.1.1. Zebra balığının morfolojisi	3
2.1.2. Model organizma olarak zebra balığı.....	3
2.1.3. Zebra balığı testis histolojisi.....	4
2.2. Pestisitler.....	6
2.2.1. Pestisitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	7
2.2.2. Pestisitlerin sınıflandırılması.....	7
2.2.3. Herbisitler.....	8
2.2.3.1. Endothall.....	8

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	10
--------------------------	----

3.1. Materyal	10
3.1.1. Zebra balığı (<i>Danio rerio</i>)	10
3.1.2. Ortam Koşulları	11
3.1.3. Zebra balığına Endothall uygulaması ve dokuların eldesi.....	11
3.1.4. Histolojik işlemler	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Fiksasyon	12
3.2.2. Dehidrasyon	12
3.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme.....	13
3.2.4. Kesit alınması	13
3.2.5. Boyama ve inceleme	14
3.2.5.1. Hematoksilen-Eozin boyama.....	14
BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	16
4.1. Zebra balığı testis dokusu histolojik bulguları	16
4.1.1. Kontrol grubu	16
4.1.2. 0,1 mg/L Endothall uygulanmış grup	17
4.1.3. 0,5 mg/L Endothall uygulanmış grup	20
4.1.4. 1 mg/L Endothall uygulanmış grup	24
BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	28
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	37

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

cm	: Santimetre
°C	: Santigrat
dk	: Dakika
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GnRH	: Gonadotropin salgılayan hormon
g	: Gram
H&E	: Hematoksilen-Eozin
LH	: Luteinleştirici hormon
LD	: Öldürücü doz
L	: Litre
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
µm	: Mikrometre
PAH	: Pulmoner arteriyel hipertansiyon
ppm	: Milyonda bir
sn	: Saniye
USA	: Amerika Birleşik Devletleri
%	: Yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1. Zebra balığı testis yapısı	11
Şekil 4.1. Kontrol grubu dokusunun 5 µm kalınlığındaki kesiti	16
Şekil 4.2. Kontrol grubu dokusunun 5 µm kalınlığındaki kesiti	17
Şekil 4.3. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup.....	18
Şekil 4.4. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	19
Şekil 4.5. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	19
Şekil 4.6. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	20
Şekil 4.7. 0,5 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	21
Şekil 4.8. 0,5 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	22
Şekil 4.9. 0,5 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	23
Şekil 4.10. 0,5 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup	24
Şekil 4.11. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup.....	25
Şekil 4.12. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup.....	26
Şekil 4.13. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup.....	27

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması	12
Tablo 3.2. Işık mikroskobu için dehidrasyon uygulaması	13
Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi	14
Tablo 3.4. Işık mikroskobu için Eozin stoğu hazırlanması	15

ÖZET

Anahtar kelimeler: Endothall, histoloji, histopatoloji, testis, zebra balığı

Bu çalışmada amacımız Endothall' in zebra balığı testis dokusu üzerine histopatolojik etkilerini belirlemektir. Endothall, öncelikle sucul yabancı otların kontrolünde kullanılan nispeten suda çözünür bir herbisittir. Her ne kadar hem toksisite hem de çevresel kalıcılığı ele alan çeşitli endothall formülasyonları ile çeşitli çalışmalar yapılmış olsada, etkisi araştırılmakta olan bir herbisittir. Aynı zamanda, herbisitler yeraltı suyuna karışır ve sucul ekosistemi etkiler. Bu maddelerin sucul ekosisteme karıştırılmasının da bazı sonuçları vardır.

Bir hafta adaptasyon sürecinden sonra erkek zebra balıkları, bir kontrol ve 3 deney grubu olmak üzere (0,1 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) 4 gruba ayrılmıştır. 5 gün maruziyetten sonra testis dokusu diseksiyon işlemi ile çıkarıldı. Dokular bouin çözeltisi ile fikse edildi ve artan etanol serilerinde dehidrasyon işlemi yapıldı. Dokular, ksilen içerisinde şeffaflaştırıldı, parafin içine gömüldü ve mikrotom ile 5 um kalınlığında kesildi. Kesitler hematoksil-eozin ile boyandı. Sonuçlar ışık mikroskobu ile değerlendirildi.

0,1 mg/L endothalle maruz kalan grupta, semifer tübüllerde vakuolizasyon, spermatidde kümelenme, sekonder (ikincil) spermilerin sayısında artış, primer (birincil) spermilerin, spermatid ve sperm hücre sayısında azalma gözlenmiştir. 0,5 mg/L endothalle maruz kalan grupta, seminifer tübüllerde vakuolizasyon tespit edildi. Spermatojenik hücrelerin sayısında azalma, sperm hücrelerinin sayısında artış, spermatidde kümelenme, seminifer tübülde birleşme ve bozulma gözlendi. 1 mg/L endothalle maruz kalan grupta, seminifer tübülde vakuolizasyon, spermatid hücrelerinde kümeleme ve azalma, bağ dokusunda kalınlaşma ve kanama gözlendi. Spermatogonyum ve spermatid hücrelerinin de bu grupta azaldığı tespit edildi. Seminifer tübül yapısında bozulma tespit edildi.

Bu çalışmanın bir sonucu olarak, endothall sucul canlılar üzerinde bazı toksik etkilere neden olabileceği ve bu nedenle bu maddenin yer altı sularına karışması sonucu sucul ekosistem için bir tehdit oluşturabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu etkileri anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

HISTOPATHOLOGICAL EFFECTS OF ENDOTHALL ON TESTIS TISSUE OF ZEBRAFISH

SUMMARY

Keywords: Endothall, histology, histopathology, testis, zebrafish

Our purpose in this study is to determine the histopathological effects of Endothall on testis of zebrafish. Endothall is a relatively water-soluble contact herbicide, primarily used to control of submerged weeds. Although many studies have been done with various endothall formulations that address both toxicity and environmental fate and persistence, it is still a herbicide under investigation for its effect. At the same time, herbicides are mixing with groundwater and affect the ecosystem in the water. There are some consequences of mixing these substances into the aquatic ecosystem.

After one week of adaptation period male zebra fish were divided into 4 groups as one control and 3 experimental groups (0,1 mg/L, 0,5 mg/L and 1 mg/L). Testis tissue were dissected after 5 day of the exposure. Tissues were fixed with bouin solution and dehydration were carried out in ascending series of ethanol. Tissues were cleared in xylene, embedded in paraffin wax and cut into 5 μ m sections with a microtome. The sections were stained with hematoxylin-eosin. Results were evaluated with light microscope.

In 0,1mg endothall exposed group, vacuolization at semiferous tubule, clustering at spermatide, increase in the number of secondary spermatocyte, decrease in the number of spermatogonia, primary spermatocyte, spermatide and sperm cells were observed. In 0.5mg endothall exposed group, vacuolization at seminiferous tubule were detected. Decrease in the number of spermatogenic cells, increase in the number of sperm cells, clustering at spermatide, unification and deterioration at seminiferous tubule were observed. Spermatogonia and spermatide cells were found to have reduction. In 1 mg endothall exposed group, vacuolization at seminiferous tubule, decrease, clustering at spermatide cells, thickening and hemorrhage at connective tissue were observed. Spermatogonia and spermatide cells were found to have reduction at this group either. Deterioration at seminiferous tubule structure were detected.

As a result of this study we can indicate that endothall may cause some toxic effects on other aquatic organisms and therefore the mixing of this material with groundwaters is thought to pose a threat to the aquatic ecosystem. However, further studies are needed to understand these effects.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Pestisitler, kolay elde edilebilirliği ve yaygın kullanımıyla birlikte çevreye yayılarak büyük boyutlarda çevre kirliliğine neden olmakta ve birçok ekosistemi olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle tarımsal alanda kullanılan pestisitler havaya ve toprağa karışarak canlılarda toksisiteye neden olmaktadır. Toprağa karışan pestisitler yer altı sularıyla göl, deniz ve akarsulara karışarak sucul ekosistemi kontamine etmekte ve bu ekosistemdeki canlılar üzerinde olumsuz etki göstermektedir. Bu toksisite sebebiyle hem karasal hem sucul ekosistemdeki canlıların üreme potansiyelleride olumsuz yönde etkilenmektedir.

Zebra balığı (*Danio rerio*) dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunabilmesi, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmesi ve çoğalması, yüksek fekondite göstermesi (ergin dişiler haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakır), dış döllemeyle üremesi, yumurta ve embriyolarının saydam oluşu, yumurta ve larva gelişiminin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve toksik ajanlara karşı embriyolarının duyarlı olması bakımından histoloji ve toksikoloji çalışmalarında oldukça sık kullanılan bir model organizma olmuştur.

Bir herbisit türevidir olan Endothall suda yaşayan yabancı otları ve algleri kontrol etmek için durgun ve akan suda kullanılan aktif bir bileşendir. Endothall iki formülasyonda mevcuttur: Hem monoamin tuzu formülasyonu hem de dipotasyum tuzu formülasyonu, su bitkilerini kontrol etmek için göllerde ve göletlerde kullanılmak üzere üretilmiştir. Monoamin tuzu içeren formülasyonlar balıklar için daha toksiktir. Dipotasyum tuzunu içeren formülasyonlar, balıkçılık alanlarında kullanım için daha uygundur.

Bu araştırma ile 0,1 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L endothall uygulanmış (5 gün) zebra balığı testis yapısı incelenmiştir. Histolojik işlemler uygulanan testis yapısı hematoxilen-eozin boyaması yapılarak işık mikroskobunda incelenmiş ve maruziyet sonrası meydana gelen anomaliler tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri

2.1.1. Zebra balığının morfolojisi

Zebra balığı, doğal olarak Güney Asya, Kuzey Hindistan, Pakistan, Bhutan ve Nepal gibi ülkelerdeki akarsularda dağılım gösteren tropikal bir tatlı su balığıdır. Kemikli balıkların (Teleostei) Actinopterygii sınıfında, Cyprinidae familyasına ait bir türdür [1]. Boyları erginlerde 5-6 cm'ye kadar ulaşabilir. Erkekler dişilerden daha ufaktır ve karınları düzdür. Bu nedenle dişiye oranla daha ince görünürler. Vücutları temelde gümüş renklidir ve boydan boya kuyruğa kadar devam eden 7 ile 9 arasında mavi çizgilere sahiptir. Hareketli bir balık türüdür ve sürü halinde yaşarlar [2]. Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede yaşayabilir. 18- 30 °C aralığında bir rahatlıkla hayatını sürdürebilmektedir. Zebra balıklarının üremeleri oldukça kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28 °C'dir [2].

2.1.2. Model organizma olarak zebra balığı

Sucul omurgalılar çevreden yayılan çeşitli stres faktörlerine diğer canlılardan daha fazla maruz kalmalarından dolayı balıklarla ilgili yapılan ekotoksikolojik araştırmalar oldukça önemlidir. Zebra balıkları, dayanıklı bir tür olmaları, kolay bulunmaları, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmeleri ve çoğalmaları, ergin dişilerin haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilmeleri, dış döllenmeyle üremeleri yumurta ve embriyoların saydam oluşu, yumurta ve larva gelişimlerinin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılan model organizmalardan biridir [3]. Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların

hastalıklarının araştırılmasında iyi bir model organizma olarak kullanılmaktadır [4]. Zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genetik yapılarının benzer oluşu, zebra balığının model organizma olarak kullanılmasının başlıca nedenleri arasındadır [5]. Zebra balığı ile gerçekleştirilen deneylerin en önemli avantajı, deneylerde çok sayıda bireyin aynı anda kullanılabilmesi olmasıdır [6]. Zebra balıklarının hayat döngüsünün laboratuvar farelerine göre daha kısa sürede tamamlanması, farelerle yapılan deneylerin aynılarının bu balık türüyle de yapılabilmesi ve hatta daha fazla neslin takip edilebilmesi (özellikle teratojenik testlerde) diğer bir tercih nedeni olmuştur [7]. Keza farelerde embriyo gelişimi anne vücudu içinde olduğu için araştırmacıya embriyoyu en başından takip etme şansını vermemektedir. Oysa zebra balığı embriyoları anne vücudu dışında gelişmekte ve böylece döllenmeden itibaren zigotun gelişimi takip edilebilmektedir [8]. Toksikoloji araştırmalarında zebra balığının tercih edilmesinin diğer bir nedeni ise uygulanan testin kısa oluşu ve sonuçların oldukça hassas oluşudur [9].

Balıklarda gonadlar dişilerde ovaryum, erkeklerde testistir. Balıklarda üreme organları vücut boşluğunun üst kısmında hava kesesinin altında uzunlamasına bir çift olarak bulunurlar. Gonadlarda ovaryumlar kesemsi yapıdayken, testislerin yapısı düz ve rengi beyazdır. Testis histolojik yapısında; bağ dokular, seminifer tübüller ve bu tübüllerdeki spermatogenez hücreleri (spermatogonyum, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatid ve sperm) ve bağ dokular arasında Leydig hücreleri görülür. Balıklarda testis yapısı türün devamlılığı için gerekli olan gonad yapılarından biridir. Gonad yapılarının üreme, türün devamlılığı ve verimli döller verebilmek için herhangi bir anomali göstermemesi gerekmektedir. Bu nedenle herhangi bir türün histopatolojik çalışmalarına ilişkin araştırmalarda gonad yapısının incelenmesi önemlidir.

2.1.3. Zebra balığı testis histolojisi

Testis dokusundaki büyük hücreli spermatogonyumlar mitotik bölünme geçirerek spermatozoidlere dönüşürler. İlk olarak primer spermatozoidlere dönüşürler. Ancak primer spermatozoidlerin döllenme yeteneği yoktur. Daha sonra primer spermatozoidler

birinci mayoza girerek sekonder spermatositleri oluştururlar. Sekonder spermatositler ikinci mayoza girerek spermatidlere dönüşürler. Spermatidler farklılaşma geçirerek döllenme yeteneğine sahip sperm hücrelerini meydana getirirler.

Zebra balığı testisleri, spermatojenik epitel ile kaplı bir dizi tübül veya kör keseler içeren, bir çift halinde yüzme kesesinin her iki yanında yer alan bir organdır [10]. Spermatogenez, çevresel olarak spermatogonyumlar ile çevrili seminifer tübüllerde gerçekleşir. Memeli spermatogenezinin aksine, belirli bir Sertoli hücresi sadece bir germ hücre klonu ile temas halindedir [11]. Spermatogenez, diploid spermatogonyumun günlük milyonlarca sperm ürettiği, karmaşık ve oldukça koordineli bir işlemdir [12]. Bu süreç hem kendi kendini yenileme ve hem de sperm gelişimine adanmış spermatogonyayı ayırt etme potansiyeline sahip olan spermatogonyal kök hücreler ile beslenir [13, 14]. Balıklarda spermatogenez, bir spermatogonium hücre dizisi ile bir veya iki Sertoli hücresinin sitoplazmik çıkıntıları ile tamamen çevrenmesiyle oluşan kistlerde meydana gelir [15]. Sertoli hücreleri, spermler üretilip lümen içerisine bırakılana kadar olan spermatojenik hücrelerinin gelişim süreci boyunca germ hücrelerini destekler ve bu hücreler ile temas halindedir [16]. Histolojik yapıda, bağ dokular, seminifer tübüller ve bu tübüllerdeki spermatogenez hücreleri (spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve sperm), ve seminifer tübüller ve bağ dokuların arasında leyding hücreleri görülür. Histolojik yapılar göz önüne alındığında spermatogenezin tüm evreleri, spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenez olarak kabul edilir. Spermatogonyum hücreleri büyük, soluk ve homojen sitoplazmaya ve çok büyük bir çekirdeğe sahiptir. Belirsiz çekirdeği olanlar spermatogonyum A hücreleri iken koyu ve berrak çekirdeği olanlar spermatogonyum B hücreleridir. Spermatogonyumlar mitotik bölünmeye sahiptir ve böylece çoğalarak spermatositlere dönüşür. Oluşan spermatosit hücreleri daha küçük ve spermatogonyumlara göre daha yoğun sitoplazmaya sahiptir. Mayoza hazırlık evresinde sitoplazma kromatin ile kaplanır. Böylece çekirdek net bir şekilde görülemezken hücreler açık bir şekilde görülmektedir. Mayoz sonucu oluşan spermatosit hücreleri primer ve sekonder spermatosit olarak ikiye bölünür. Primer spermatosit hücreleri oval ve yoğun sitoplazmaya sahiptir. Mayozun ilk evrelerinde, yoğun kromatin ile kaplı primer

spermatozit hücrelerinin belirsiz hücre çekirdeğine sahip olduğu ve sekonder spermatozitlerin primer spermatozitlerle benzer şekilde olmasına rağmen daha küçük ve yuvarlak olduğu görülür. Sekonder spermatozitlerin mayozu sonucu spermatidler meydana gelir. Son evre olarak spermatidler küçülerek kuyruk benzeri yapıları bulunan sperm hücrelerini oluşturur [17]. Spermatogenez süreci, hipofiz hormonları tarafından düzenlenir. Spermatogenez düzenleyen iki ana hipofiz hormonu folikülü uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize yapıcı hormondur (LH). Bu hormonlar ön hipofizden gonadotropin salgılayan hormona (GnRH) cevaben üretilir. Bu hormon hipotalamustaki nöronlardan salgılanır ve hipofizdeki endokrin hücreleri FSH ve LH salgılaması için uyarır [18]. Steroid üreten Leydig hücreleri hem LH hem de FSH tarafından düzenlenebilir, ancak Sertoli hücreleri genel olarak sadece FSH ile düzenlenebilir [16]. Leydig hücreleri tarafından LH ve FSH'ye yanıt olarak üretilen ana steroidler androjenlerdir [19]. FSH Leydig hücrelerini androjenler üretmeye teşvik eder ve bu da spermatogonyumun sertoli hücreleri ile çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır [20].

2.2. Pestisitler

Pestisitler besin maddelerinin üretimi, tüketimi ve depolanmaları sırasında besin değerini bozan ve bitkilere zarar veren böcekleri, mikroorganizmaları ve diğer zararlıları yok etmek için kullanılan kimyasal maddelerdir. Bu zararlılara karşı tarımsal mücadele yapılmadığı takdirde, her yıl ortalama %35 civarında ürün kaybının meydana geleceği belirtilmektedir [21]. Çeşitli taşınım mekanizmaları ile denizel ortama ulaşan pestisitler akıntı, dalga gibi yollarla seyrelerek yayılma gösterirler [22]. Deri geçirgenliği de bir çeşit biriktirme yolu olup sert kabuklu küçük omurgasızlar bu maddeleri bazı özel bölümleri ile alırlar. Balıklar insektisitleri vücutlarında yoğunlaştırırlar. Balıklardaki insektisit yoğunluğu sudakinin 1000-10000 katına çıkabilmektedir. Balıklarla beslenen canlılarda ise bu düzey daha yüksek boyutlara ulaşmaktadır. Avcı türlerin plankton yiyicilerden daha fazla kimyasal atığı konsantre ettiği bildirilmiştir [23].

2.2.1. Pestisitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Pestisitlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri, aktivitelerinin ve sucul sistemler üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde önemlidir [24]. Pestisitler farklı çözünürlük değerlerine sahiptirler. Çoğu pestisit için sudaki çözünürlük ppm seviyesindedir. Pestisitlerin sudaki çözünürlüklerine kimyasal yapılarının yanı sıra sıcaklık, pH, sudaki tuz ve organik madde derişimi gibi parametreler de etkilidir [25]. Pestisit kimyasal yapısı, su sistemlerindeki kararlılığını belirler. Pestisitlerin kararlılıkları, kalıntı olarak yıllarca dayanabilen çok kararlı bileşiklerden birkaç saat içinde bozulan bileşiklere kadar değişebilir. Su ekosistemindeki kararlılık; organoklorürlü, organofosforlu ve karbamatlı pestisitler sırasına göre azalmaktadır. Kararlı pestisitler su ekosistemi için potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Uygulanma sonrasında organizmalar uzun süre pestisitlere maruz kalacaklarından, kararlı pestisitlerin balık ve diğer sucul organizmalarda birikme potansiyeli vardır [24].

2.2.2. Pestisitlerin sınıflandırılması

Pestisitler, zararlı organizmaların olumsuz etkilerini engellemek ya da kontrol altına alabilmek için kullanılan kimyasallardır. Kullanım alanları çok geniş olan bu kimyasalların toprağa uygulamada %10-30'u, püskürtmeli kullanımlarında ise %50-75'i hedef canlıların haricinde çevreye taşınarak ekosistemlere geçebilmektedir [26]. Uzun süre çevrede kalabilen pestisitler, mutajen, teratojen ve daha önemlisi kanserojen olabilirler. Pestisitler diğer toksik materyallerden kimyasal ve sosyal olarak ayrı bir sınıfta tutulur. Çünkü onların toksik etkisi doğrudan belirli bir organizmayı etkilememektedir [27]. Bu yüzden pestisitler etkiledikleri organizma ve bileşimindeki etkili maddeye göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmıştır [28]. Etkili oldukları canlı gruplarına göre; İnsektisitler (böcek öldürücüler), herbisitler (bitki öldürücüler), fungisitler (mantar öldürücüler), rodentisitler (kemirgen öldürücüler), nematositler (yuvarlak solucan öldürücüler), mollusitler (yumuşakça öldürücüler), algisitler (alg öldürücüler), akarasitler (akar öldürücüler), avisidler (kuşları kaçırmak için kullanılır), aktraktanlar (çekiciler) olarak sınıflandırılır. Bileşimindeki etkili madde grubuna göre; Anorganik pestisitler; Arsenikli, civalı, florürlü, pestisitler,

bakırlı, elementer kükürt, Sentetik organik pestisitler; Organoklorürler, organofosfatlar, organosülfürler ve karbamatlar, Doğal organik pestisitler; Rotenonlar, pyrethrum, nikotin ve allethrin olarak sınıflandırılırlar ve değişik şekillerde su kaynaklarına ulaşırlar [29]. Kimyasal yapı ve bileşimlerindeki etkin maddelere göre su içerisinde taşınımı ve kalış süreleri değişkenlik göstermektedir. Bu zaman zarfında hedef organizmaya seçkin etkinlik gösteremedikleri için başka organizmalarda da çeşitli hastalıklara yol açar hatta öldürücü olabilirler [30].

2.2.3. Herbisitler

Pestisitler içerisindeki yeri her geçen gün geniş ölçüde artan herbisitlerin kullanılma sahasındaki artış, beraberlerinde birçok sorunları getirmektedir. Herbisitlerin canlılar aleminde yan etkileri (toksikitesi) bu sorunların en önemlilerinden birisidir. Herbisitlerin doğrudan kullanılma amaçlarının dışında, önlenmesi mümkün olmayan ve katlanmaya zorunlu olduğumuz tesirlerine yan etkiler denilmektedir [31]. Herbisitlerin bilinen yan etkileri arasında arılar, kuşlar ve balıklar, mikroorganizmalar ve omurgasızlar gibi hedef olmayan organizmalarda ölümler [32, 33], kuş, balık ve diğer organizmalarda üreme potansiyelinin azalması [33], ekosistemin yapısının ve türlerin sayılarının değişmesi gibi uzun dönemli etkiler bulunmaktadır [34].

2.2.3.1. Endothall

Endothal, ilk kez 1960'lı yılların başlarında üreticisi Penwalt Corporation tarafından ve daha yakın zamanda Kuzey Amerika'dan Elf Atochem tarafından üretilen [35] ayrıca kurutucu ve yaprak döken ilaç özellikleri ile ilk kez 1950'li yıllarda karasal bitkiler üzerinde tanımlanmış bir kontak herbisittir [36]. Farklı atomlu halkalı (heterocyclic) bir bileşik olan endothallin yabancı ot öldürücü niteliği, ilk kez 1948'de belirlenmiştir [37]. Endothall, yalnızca karbon, hidrojen ve oksijen içeren nispeten basit bir moleküldür. Kalıcı veya egzotik bozunmalar / metabolitlere katkıda bulunabilecek azot, kükürt, halojenür, metal veya başka bir element yoktur [38]. Endothall (7-oksabisiklo [2,2,1] heptan-2,3-dikarboksilik asit), suda yaşayan yabancı

otları ve algleri kontrol etmek için durgun ve akan suda kullanılan aktif bir bileşendir. Endothall ilk olarak 1929'da blister böcekleri (*Epicauta spp.*) tarafından üretilen doğal bir bileşik olup cildi tahriş eden cantharidin türevidir [39]. Endothallin hareket şekli tam olarak anlaşılmamıştır, ancak endothallin faaliyetini açıklamak için birkaç hipotez vardır. Hipotezlerin tümü, endothallin, hücresele seviyede, dipeptidaz ve proteinaz enzimlerini etkileyerek protein sentezine müdahale etme gibi biyokimyasal süreçleri bozduğunu gösterir. Bu enzimler, bitki tarafından büyüme için kullanılan proteinlerin üretimini desteklemek için gereklidir [40]. Endothallin sodyum, potasyum ve mono (N,N-dimethyl) tuzlarını içeren, sıvı ve tanecikli hazır ilaçlar üretilmiştir. Endothall bazen bakır ile birlikte de kullanılmaktadır. Endothall su bulunan çevrelerde hızla ve tümüyle parçalanmakta, parçalanma oranı su sıcaklığı ile minik canlı etkinliklerine bağlı bulunmaktadır [41]. Endothall iki formülasyonda mevcuttur: Hem monoamin tuzu formülasyonu hem de dipotasyum tuzu formülasyonu, su bitkilerini kontrol etmek için göllerde ve göletlerde kullanılmak üzere üretilmiştir. Endothall sucül ortamda oldukça kısa ömürlüdür; dipotasyum tuzu formülasyonunun yarı ömrü 3 gündür, alkilamin tuzunun yarı ömrü 14 ila 21 gündür [42].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Zebra balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı (*Danio rerio*) Cyprinidae familyasına ait anavatanı Güneydoğu Asya olan tropikal bir türdür. Baskın olarak Pakistan ve Hindistan'da bulunmaktadır. Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür [43]. Uygun koşullar altında bakımının kolay olması, çok sayıda yumurta vermesi ve yumurtalarının şeffaf olması nedeniyle 1930'lu yıllardan beri yaygın olarak bilimsel araştırmalarda kullanılan bir türdür. Genç bireylerin boyları 4,5-5 cm uzunluktadır. Erkek bireyler dişi bireylerden morfolojik olarak farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptirler [44]. Zebra balığının gelişimi, yüksek omurgalıların embriyogenezine çok benzer ancak memelilerden farklı olarak şeffaf bir yumurta dışında ovipar üreme göstermektedir [45]. Zebra balığının embriyonik gelişimi çok hızlıdır. Döllenmeden sonra ilk 24 saat içinde tüm önemli organları gelişir. Döllenmeden sonraki 72. saatten itibaren zebra balıklarında larva dönemi başlar. Bu dönemde larvalar 3.5 mm uzunluğunda ve yüzme hareketi nadir olarak görülür. 74-75 günlük zebra balıklarından erkekler yaklaşık 23,1 mm uzunluğuna, dişi bireyler ise 24,9 mm uzunluğa ulaştıklarında üreme davranışı gösterebilmektedirler. Dişi zebra balığı yaşamı boyunca 1500-1800 arasında yumurta verebilmektedir ve bir üreme döneminde 150-400 arasında yumurta üretebilmektedir [46].

3.1.2. Ortam Koşulları

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Balık Yetiştirme Laboratuvarı içinde zebra balığı ile yapılacak deneyler için 15 x 28 x 37 cm boyutlarında akvaryumlar kuruldu. Akvaryum içerisine klordan arındırılmış çeşme suyu konularak sıcaklık, termostatlar ile 26 – 28 °C'ye sabitlendi. Ayrıca oda içerisinde 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak sirkadien ritim oluşturuldu. Akvaryumlar, biri kontrol, diğerleri deney grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve balıklar her grupta 10 erkek balık olacak şekilde akvaryumlar içerisine yerleştirildi.

3.1.3. Zebra balığına endothall uygulaması ve dokuların eldesi

Bir haftalık adaptasyon sürecinin ardından deney gruplarındaki erkek zebra balıklarına 0,1 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/l endothall uygulaması yapıldı ve 120 saat (5 gün) endothall ile muamele edildi. 5 günlük endothall uygulamasının ardından erkek zebra balıklarına diseksiyon işlemi yapıldı ve testis dokuları çıkarıldı.



Şekil 3.1. Zebra balığı testis yapısı (⇨): Testis dokusu

3.1.4. Histolojik İşlemler

Çıkarılan testis dokusu Bouin çözeltisi (max. 24 saat) ile fikse edildi ve ardından yükselen etanol serilerinden geçirilerek dehidrasyon gerçekleştirildi. Ksilol ile şeffaflaştırılan dokular parafin bloklara gömüldü. Leica marka mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alınıp ve boyama işlemi yapıldı. Leica marka ışık mikroskopunda incelendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fiksasyon

Elde edilen testis dokuları Bouin çözeltisi (Tablo 3.1.) ile fikse edildi.

Tablo 3.1. Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması

Solüsyon Adı	Solüsyonun İçerdiği	Madde	Uygulama Süresi
	Maddeler	Miktarı	
BOUIN	Suda Doymuş pikrik asit	75 mL	2-24 saat
	%40 Formaldehit	25 mL	
	Glasiyal asetik asit	5 mL	

3.2.2. Dehidrasyon

Dehidrasyon, dokuda var olan sudan ve tespit solüyonundan kurtarılması, arındırılması aşamasıdır. Doku dehidrasyonu için yükselen (%70, %95, %100'lük) alkol konsantrasyonları kullanıldı ve dokunun suyu yavaş yavaş alınarak doku büzülmesini önleyip dokuya sertlik kazandırıldı (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Işık mikroskobu için dehidrasyon uygulaması

Solüsyon Adı	Solüsyonun İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı	Uygulama Süresi
%70 Alkol	Etanol	70 mL	1 gün
	Distile su	30 mL	
%80 Alkol	Etanol	80 mL	1 gün
	Distile su	20 mL	
%90 Alkol	Etanol	90 mL	1 gün
	Distile su	10 mL	
%95 Alkol	Etanol	95 mL	1 gün
		5 mL	
%100 Alkol	Etanol	100 mL	1 gün

3.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Dehidrasyon işleminde yükselen alkol serileriyle dokulardaki su uzaklaştırıldı. Ksilol ile 3 gün muamele edilerek şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Ardından dokular sıvı parafin ile kesit alma düzlemi olan bloklara gömüldü.

3.2.4. Kesitlerin alınması

Dehidrasyon ve şeffaflandırmadan sonra dokuların mikrotom ile kesilebilmesi için sertleştirilmesi gerekir. Bu işlem için en çok parafin kullanılmaktadır. Doku sertleştirmede amaç, sıcak sıvı parafinin dokuya nüfuz ederek şeffaflaştırıcı maddeyle yer değiştirmesidir. Parafin blok içerisinde gömülü olan dokulardan Leica marka döner mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosuna atılarak albümin mayer sürülmüş lamlara alındı. Bir gece kuruyup lam üzerine yapışması beklenildi.

3.2.5. Boyama ve inceleme

3.2.5.1. Hematoksilen-Eozin

Histolojik rutin incelemeler için genellikle hematoksilen-eozin birleşik boyama yöntemi kullanılır. Temel prensibi, mavi-mor renk veren hematoksilen ile, pembemsi kırmızı renk veren eozin'in hücreleri boyamasıdır. Hücre çekirdekleri koyu mavimenekşe renginde boyanırken sitoplazma pembe-kırmızı renk boyanır. Nukleus ve sitoplazma ayırımında histolojik boyalar içinde en geniş kullanımı olan boyama yöntemidir (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

Parafinden kurtarma	Ksilen	3x3 dk
Hidratasyon	%100 Etanol	3x1 dk
	%80 Etanol	30 sn
	%50 Etanol	30 sn
	%30 Etanol	30 sn
Akarsu altında		30 sn
HarrisHematoksilen		4-5 dk
Distile su		4 dk
%95 Etanol		30 sn
%95 Etanol		30 sn
Eozin		30 sn
%100 Etanol		1,5 dk
Ksilol		45 sn
Entellan ile kapama		

Tablo 3.4. Işık mikroskobu için Eosin stoğu hazırlanması

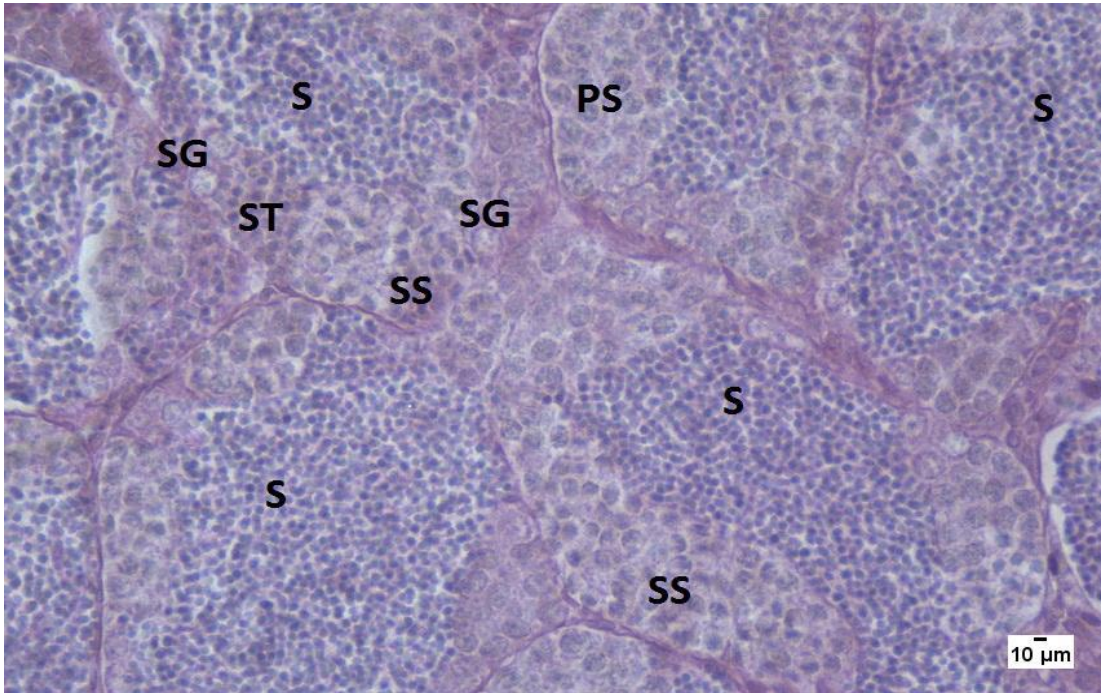
Eozin Stoğu	Miktarı
Eozin Y	10 g
Potasyum Dikromat	5 g
Suda Doymuş Pikrik Asit	100 mL
%100 Etanol	100 mL
Distile su	800 mL
Glasiyal Asetik Asit	10 damla

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

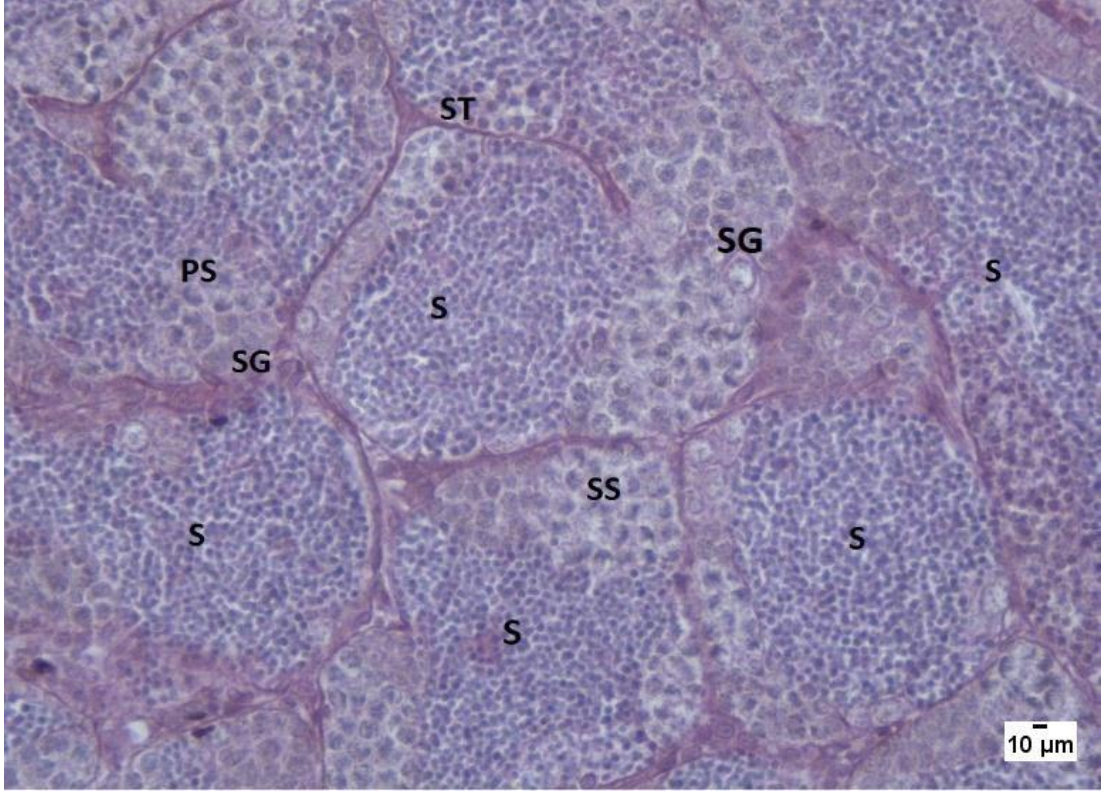
4.1. Zebra Balığı Testis Dokusu Histolojik Bulguları

4.1.1. Kontrol grubu

Kontrol grubunda normal testis histolojisi gözlemlendi. Kontrol grubunda spermatogonyum, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatid ve sperm hücreleri görüldü. Spermatogonyumlar, sperm ana hücreleri olması nedeniyle seminifer tübüllerde bazal lamina sınırında en büyük spermatogonik hücreler olarak tespit edildi. Oluşan sekonder spermatozoid hücreleri primer spermatozoidlere göre daha küçük ve yuvarlak. Mayoz bölünme sonucu oluşan spermatidler farklılaşarak daha küçük ve koyu görümlü sperm hücrelerini meydana getirir. (Şekil 4.1., Şekil 4.2.).



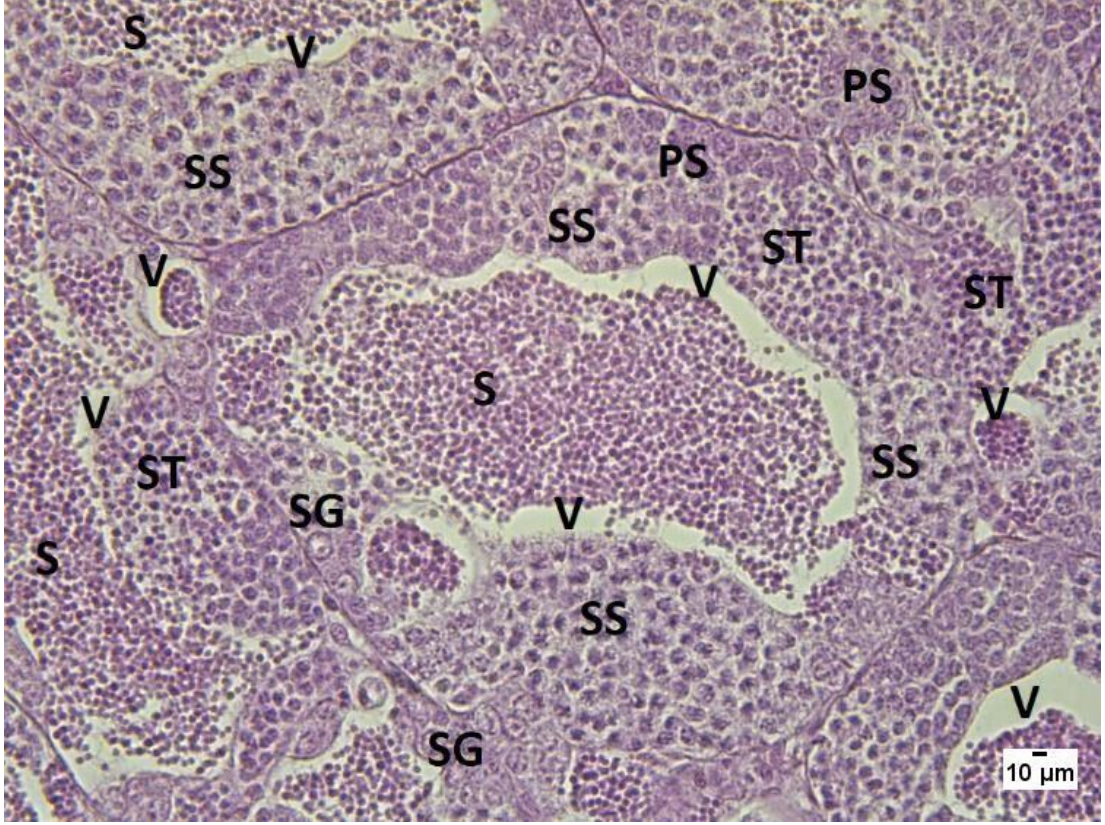
Şekil 4.1. Kontrol grubu testis dokusu kesiti; SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozoid, SS: Sekonder spermatozoid, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



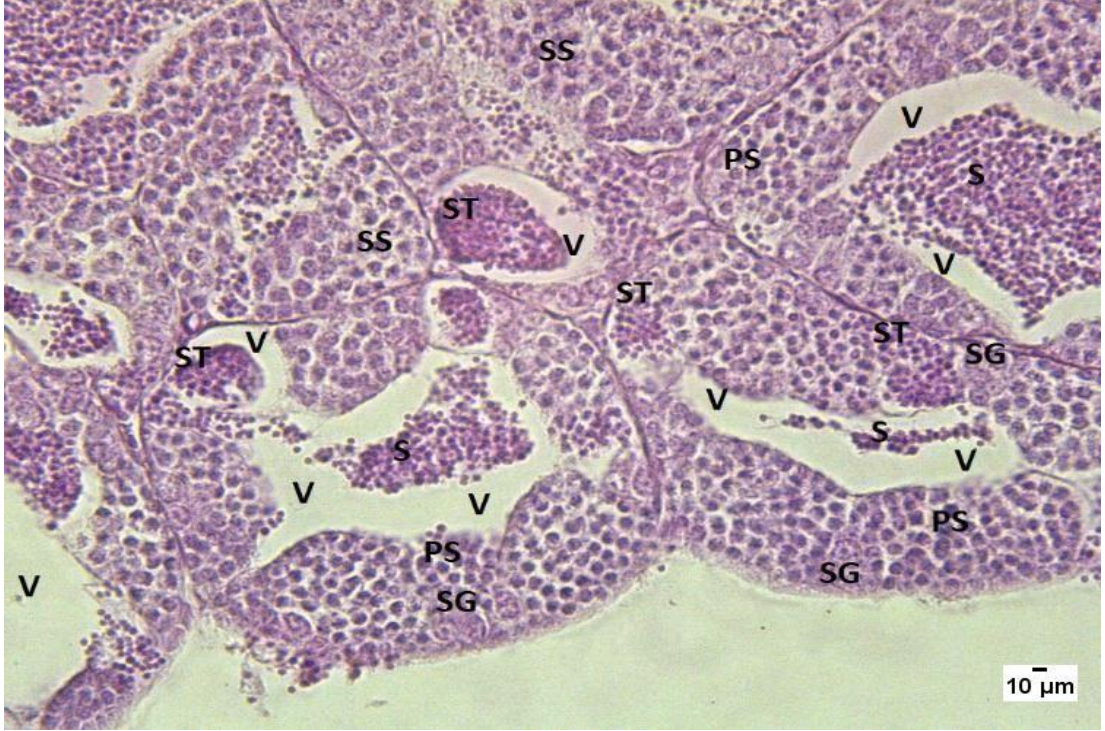
Şekil 4.2. Kontrol grubu testis dokusu kesiti; SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozoid, SS: Sekonder spermatozoid, ST: Spermatozoid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40

4.1.2. 0,1 mg/L Endothall Uygulanmış Grup;

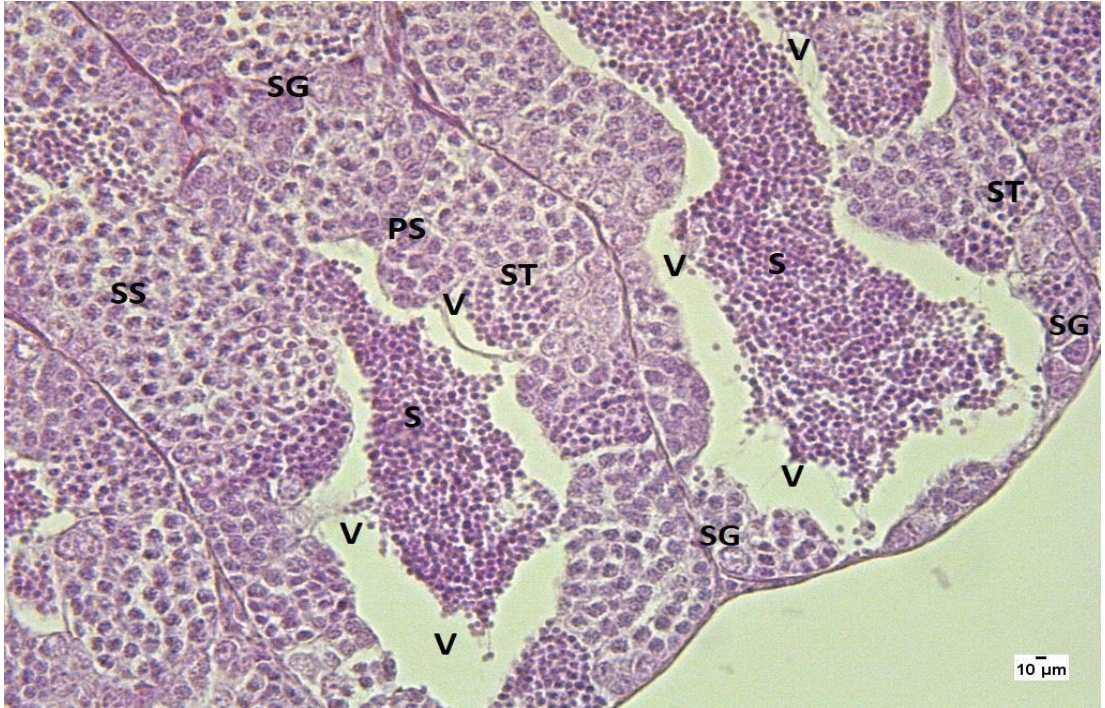
0,1mg/L Endothal uygulaması yapılmış grup kontrol grubu ile kıyaslandığında primer (birincil) spermatozoidlerde vakuolizasyon (Şekil 4.5.), seminifer tübül vakuolizasyon (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.), spermatogonyum, spermatozoid, primer (birincil) spermatozoidde azalma (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.) spermatozoidlerde kümelenme (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5), sekonder spermatozoidlerde artmalar gözlenmiştir (Şekil 4.6.).



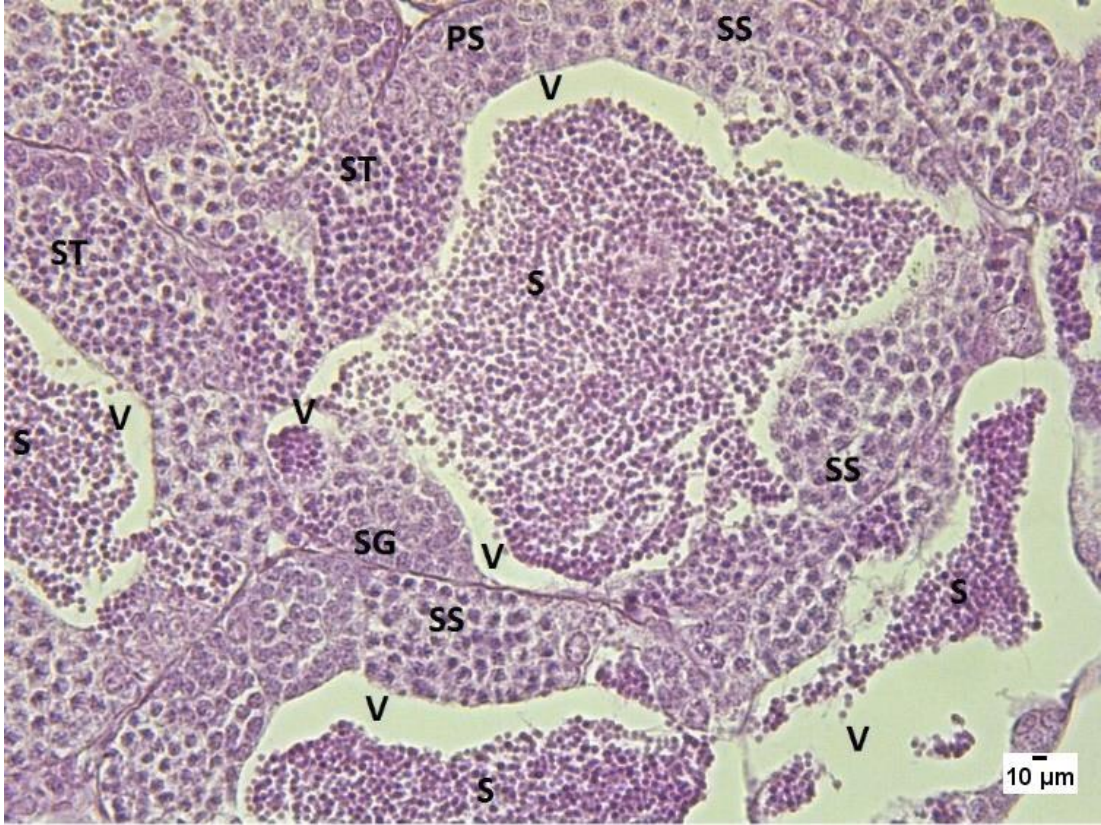
Şekil 4.3. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), Spermatogonyum,, primer spermatositlerde ve spermatidlerde azalma, Spermatidlerde kümeleme, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



Şekil 4.4. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Semifer tübüllerde vakuolizasyon, spermatogonyumda spermatid ve sperm hücrelerinde azalma, Spermatidlerde kümelenme, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS:Primer spermatosit, SS:Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



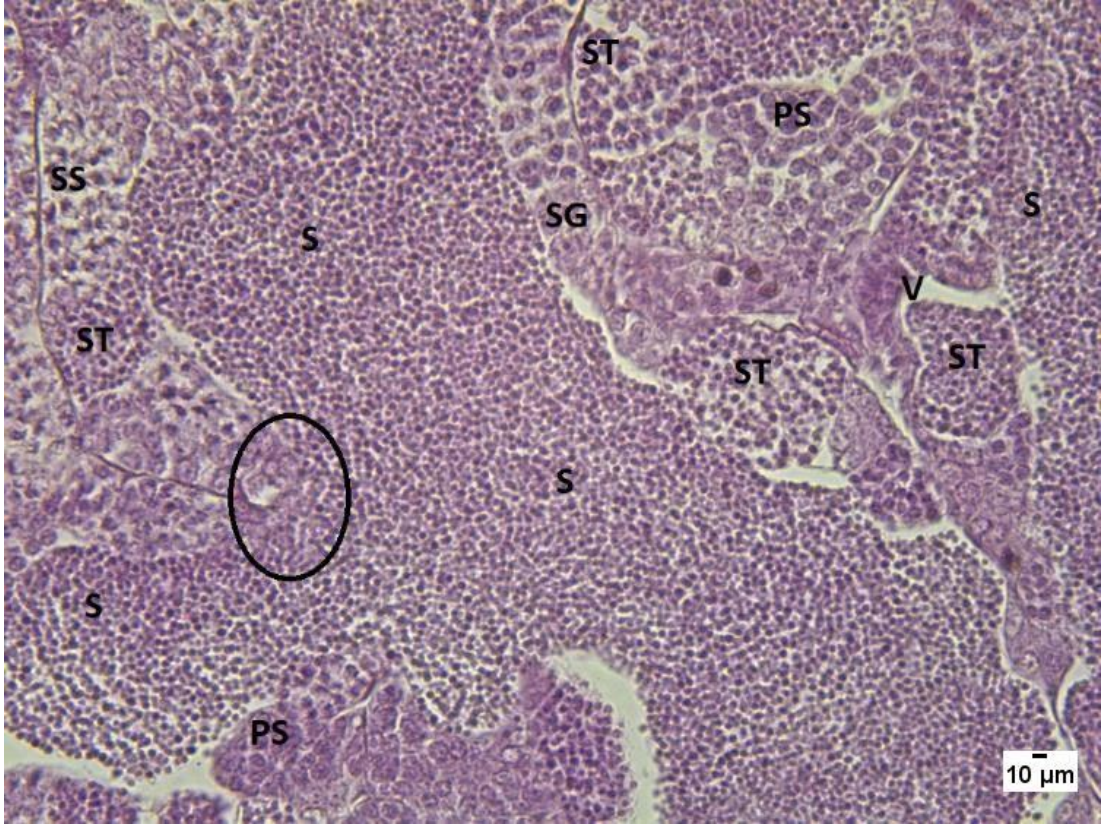
Şekil 4.5. 0,1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Semifer tübüllerde, primer spermatositlerde vakuolizasyon, Spermatogonyumda, spermatid ve sperm hücrelerinde azalma, Spermatidlerde kümelenme, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



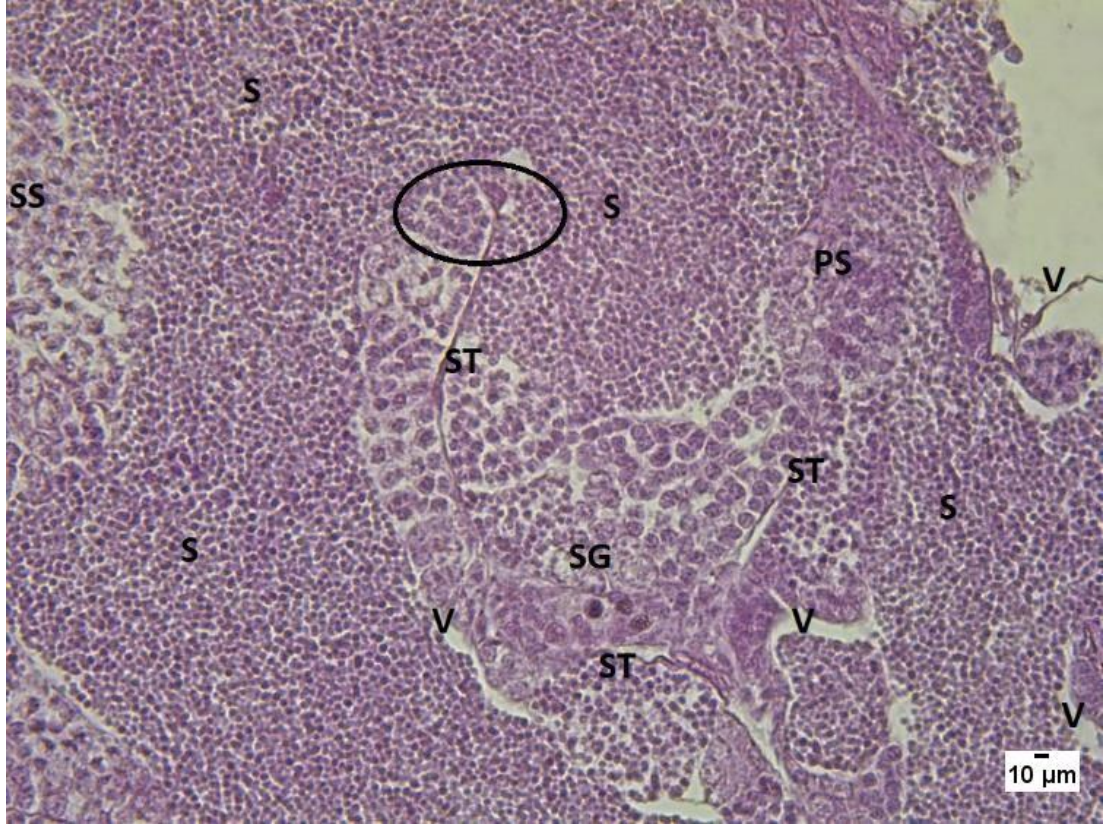
Şekil 4.6. 0,1 mg/L Endothall uygulanması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Sperm hücrelerinde, sperm ve spermatogonyumda azalma, Sekonder spermatositlerde artma, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40

4.1.3. 0,5 mg/L Endothall Uygulanmış Grup;

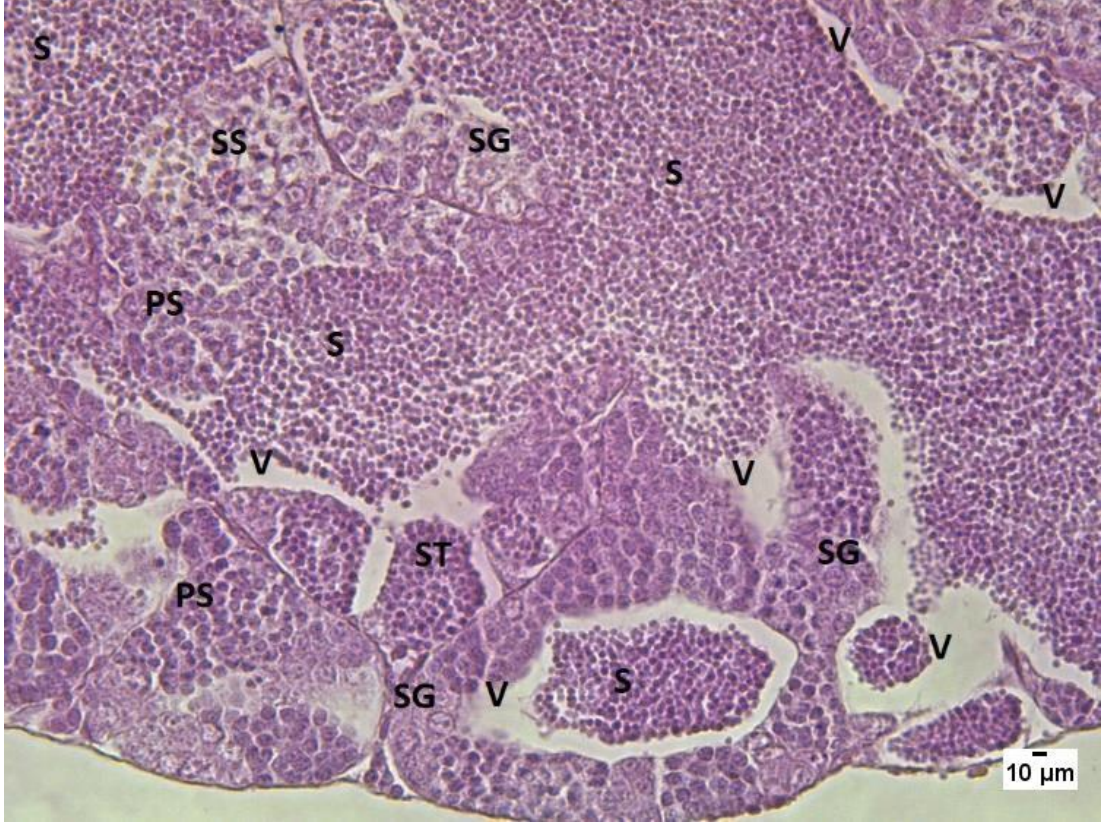
0,5 mg/L Endothal uygulaması yapılmış grupta elde edilen sonuçlara göre; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.), spermatogonyumlarda, (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9) primer (birincil) spermatosit, sekonder (ikincil) spermatosit,ve spermatidlerde azalma(Şekil 4.10.), seminifer tübül yapısında birleşme (Şekil 4.7., Şekil 4.8.), spermatidlerde kümelenme (Şekil 4.8.), seminifer tübüllerde primer (birincil) spermatosit, sekonder (ikincil) spermatosit ve spermatogonyumların bazı bölgelerde oluşmadığı (Şekil 4.10.) gözlenmiştir. 0,1mg/L endothall uygulaması yapılmış grupla karşılaştırıldığında seminifer tübül yapısının bozularak birleşmesi, seminifer tübüllerde, primer (birincil) spermatosit, sekonder (ikincil) spermatosit ve spermatogonyumların bazı bölgelerde oluşmadığı gözlenmiştir.



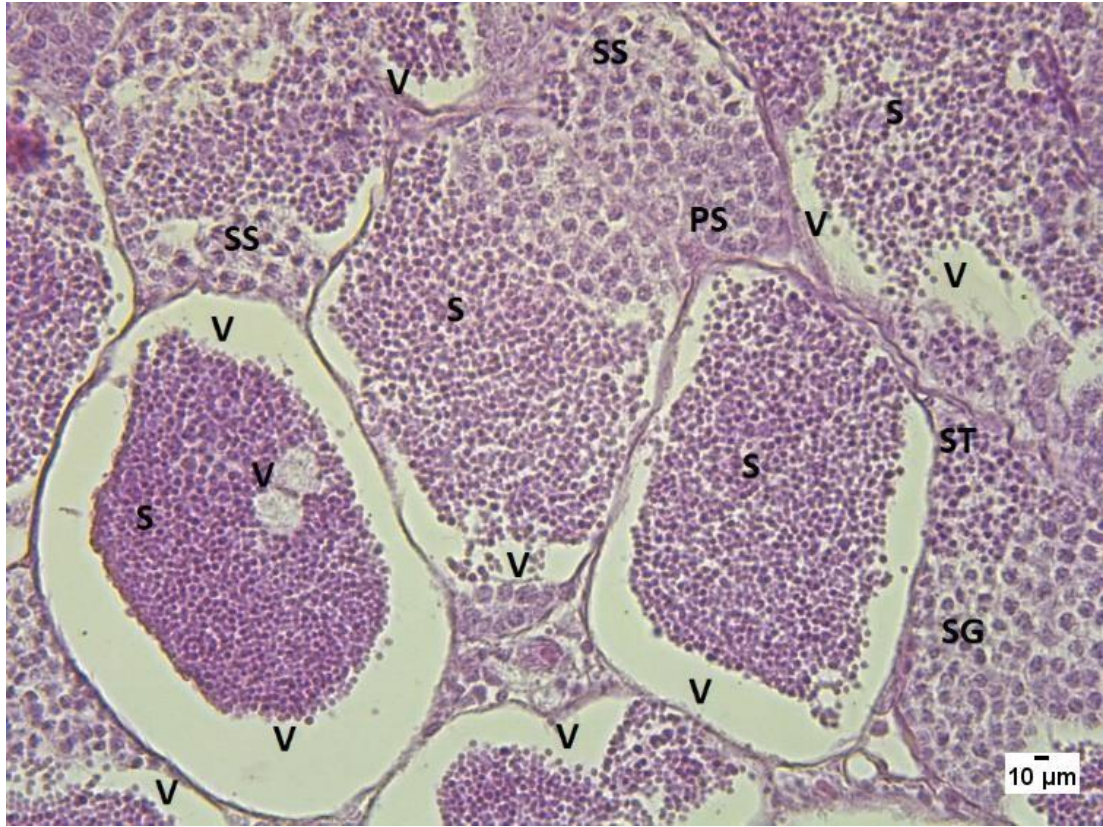
Şekil 4.7. 0,5 mg/L Endothall uygulanması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon ve seminifer tübül yapısında birleşme(●)spermatogonyumlarda, primer spermatozoid ve sekonder spermatozoidlerde azalma, Sperm hücre sayısında artış, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozoid, SS: Sekonder spermatozoid, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



Şekil 4.8. 0,5 mg/L Endothall uygulanması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon ve seminifer tübüllerde birleşme (○), spermatogonyumda, sekonder spermatositte azalma, spermatidlerde kümelenme ve sperm hücre sayısında artış V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



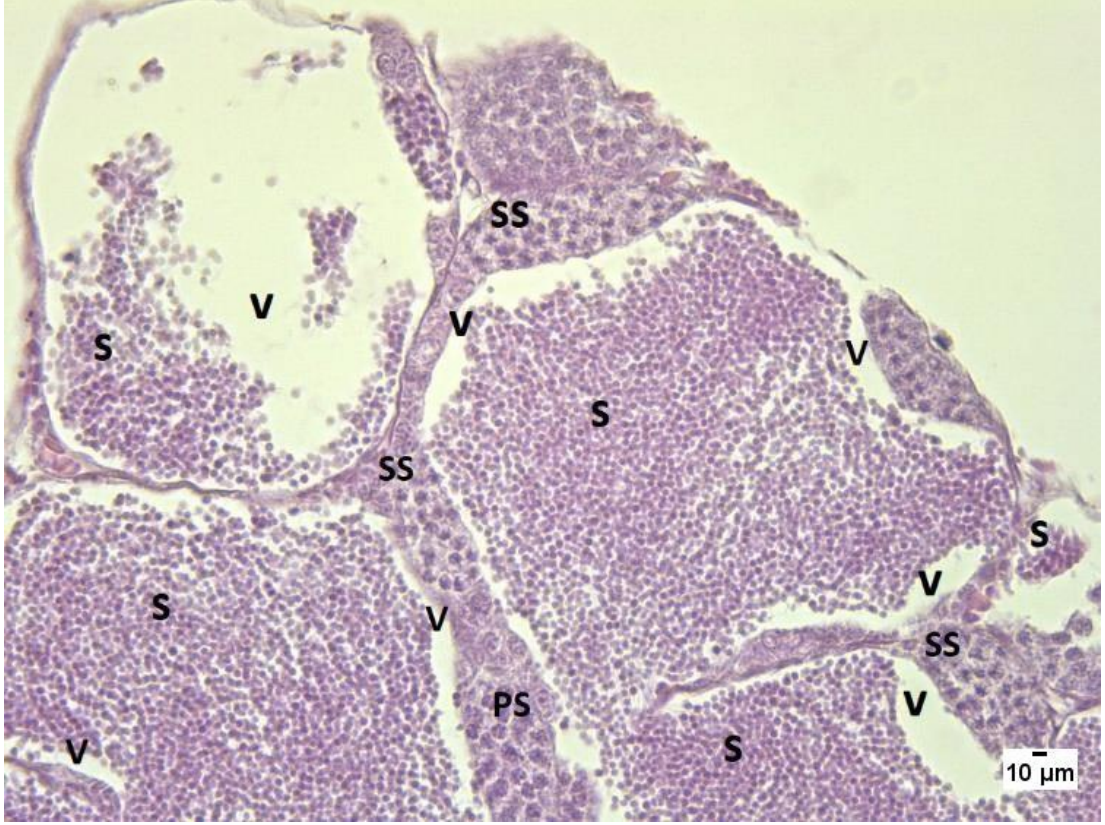
Şekil 4.9. 0,5 mg/L Eⁿdotal uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Seminifer tübül yapısında bozulmalar, Sperm hüce sayısında artış, Spermatogonyum ve primer spermatositlerde azalma, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40



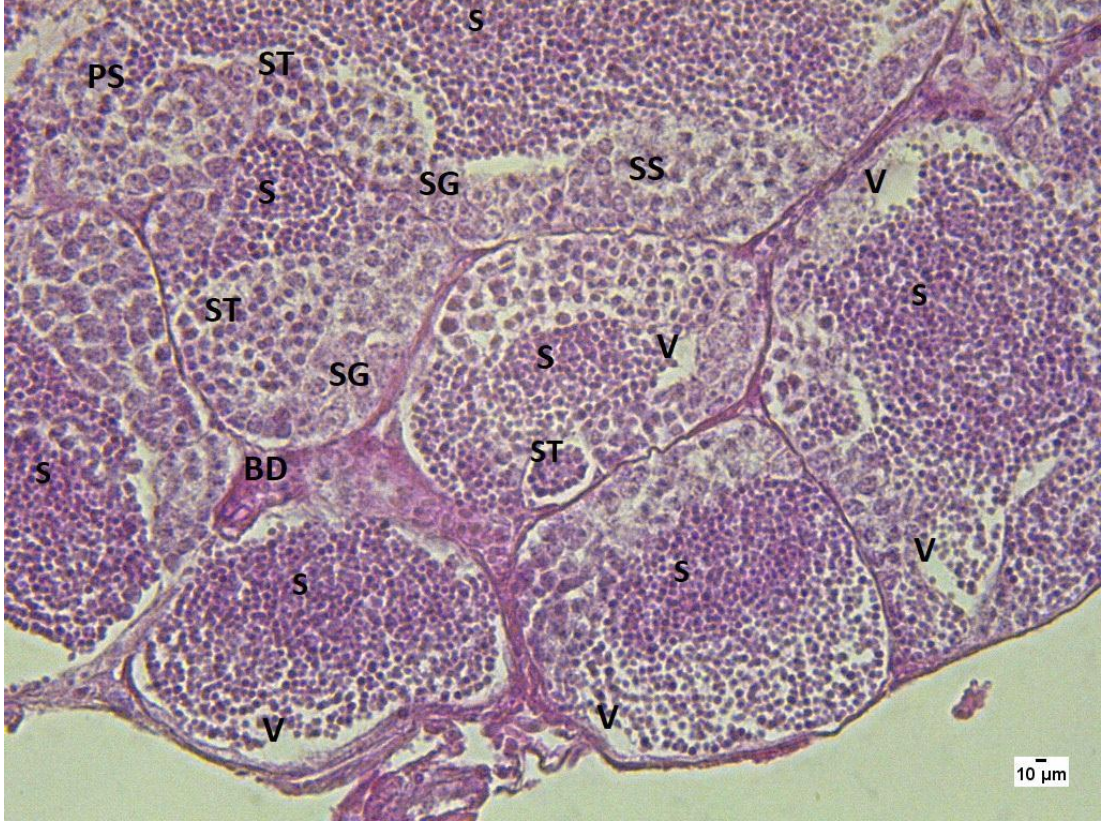
Şekil 4.10. 0,5 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Seminifer tübül yapısında bozulma, Spermatogonyum ve spermatidlerde azalma, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozoid, SS: Sekonder spermatozoid, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyama X40

4.1.4 1 mg/L Endothall Uygulanmış Grup;

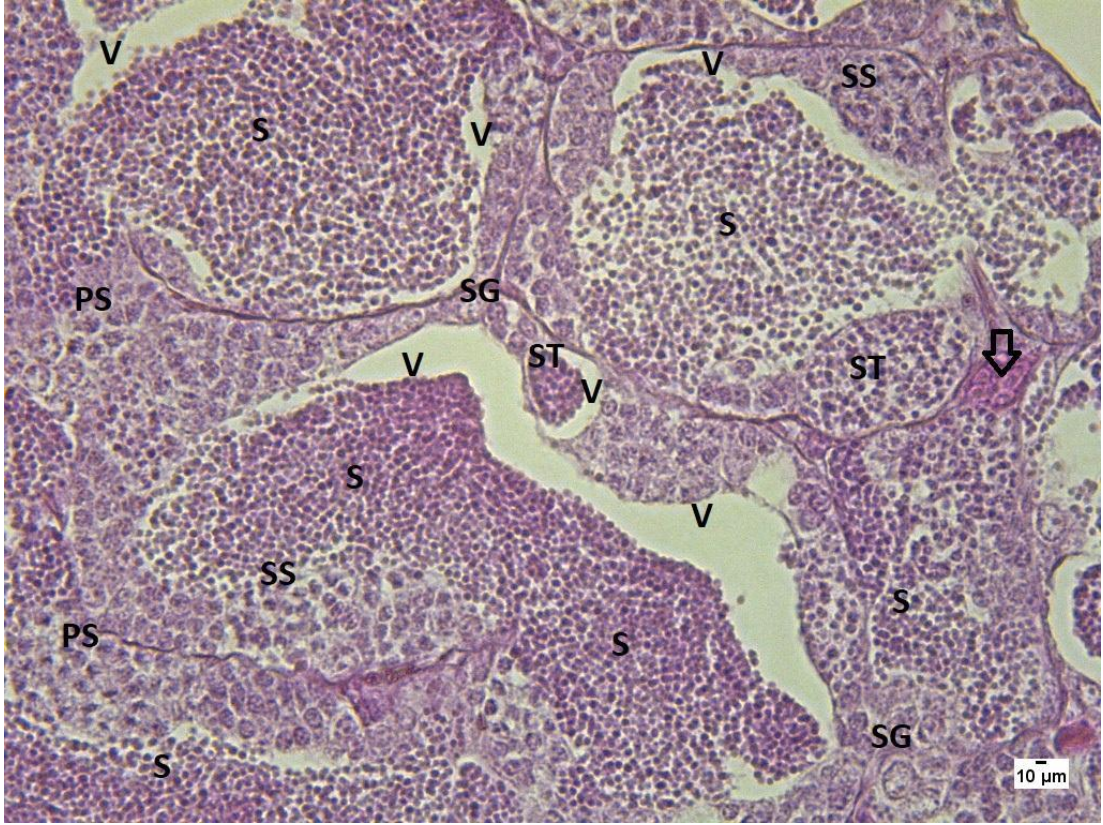
1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grupta elde edilen sonuçlara göre; seminifer tübüllerde vakuolizasyon (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13), seminifer tübül yapısında (Şekil 4.13.) ve sperm hücrelerinde bozulmalar (Şekil 4.11.), Spermatidlerde (Şekil 4.11) ve spermatogonyumlarda ileri derecede azalma (Şekil 4.11, Şekil 4.12., Şekil 4.13.), spermatidlerde kümelenme (Şekil 4.12., Şekil 4.13.), spermatogenik hücre kümelerinde belirgin azalma, bağ dokuda kalınlaşma (Şekil 4.12.), bağ dokuda kanlanma (Şekil 4.13.) ve spermatogenik hücre kümelerinde belirgin azalma (Şekil 4.11., Şekil 4.12. Şekil 4.13.) 0,1 mg/L ve 0,5 mg/L endothall uygulaması yapılmış grupla kıyaslandığında, en belirgin anomalilik farklılık bağ dokuda kalınlaşma ve bağ dokusundaki kanlanma olarak dikkat çekmektedir.



Şekil 4.11. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Seminifer tübül bütünlüğünün bozulması, Spermatid ve spermatogonyumda ileri derece azalma, V: Vakuolizasyon, SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS: Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi. H&E boyaması X40



Şekil 4.12. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Spermatidlerde kümelenme, Spermatogonyumda azalma, Bağ dokuda kalınlaşma, V: Vakuolizasyon, BD: Bağ doku SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozoid, SS Sekonder spermatozoid, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi, H&E boyama X40



Şekil 4.13. 1 mg/L Endothall uygulaması yapılmış grup; Seminifer tübüllerde vakuolizasyon, Spermatidlerde kümelenme, Spermatogonyumda azalma, seminifer tübül bütünlüğünün bozulması Bağ dokuda kanlanma, V: Vakuolizasyon, BD: Bağ doku SG: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, SS Sekonder spermatosit, ST: Spermatid, S: Sperm hücresi, H&E boyama X40

Genel olarak deney grupları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında seminifer tübüllerin yapısında ve bağ dokusu yapısında deformasyonlar meydana geldiği gözlemlendi. Uygulanan doz artışına paralel olarak seminifer tübüllerin yapısında gözlenen histopatolojik değişimlerin de arttığı tespit edildi. Spermatid ve spermatogonyumlarda hücre kümelerinde azalma, seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde primer ve sekonder spermatosit hücrelerinin kümelerinin gözlenmediği, sperm hücre sayısında artış gözlenmiştir. Ayrıca, doz artışıyla birlikte bağ dokudaki kalınlaşma ve bağ dokusundaki kanlanma dikkat çekmişti. Spermatogonyumlar ve ayrıca primer ve sekonder spermatidlerdeki azalmalar sonucu endothallin zebra balığının üremesini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Herbisit uygulamalarının çoğu hedef alınan canlı üzerine ulaşmaktayken bir kısmı hedef olmayan organizmalara ve toprağa ulaşmakta ve çevredeki doğal ekosistemlere sürüklenme ve akıntı nedeniyle kimyasal kirleticiler olarak sulara karışmaktadır. Etkili olması, uygulanabilirliğinin kolay olması ve düşük maliyetli olması sebebiyle herbisitlerin kullanımı ülkemizde her geçen gün giderek artmaktadır. Bu artış beraberinde birçok sorunları getirmektedir. Toprağa, özellikle de suya karışan herbisitlerin yabancı ot kontrolünün yanında sucul ekosistemdeki balıklara olan olumsuz etkileri bilinmektedir. Yabancı ot ve alg kontrolünde sıkça kullanılan bir herbisit türü olan endothall, kullanım sıklığına bağlı olmakla birlikte su kontaminasyonuna sebep olmakta ve sucul ekosistemi tehdit etmektedir.

Bu çalışmada bir herbisit türü olan endothallin zebra balığı testis dokusu üzerindeki histopatolojik etkileri incelenmiştir. Laboratuvar ortamında erkek zebra balıkları 0,1 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L dozlarında endothalle maruz bırakılmıştır. 120 saat boyunca (5 gün) boyunca endothall dozu uygulanmış ve 5. günün sonunda diseksiyon işlemi gerçekleştirilerek testis dokuları elde edilmiştir. Elde edilen dokular standart histolojik prosedürlerden geçirilerek hematoksil-eozin boyama ile boyanmış ve ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre seminifer tübül yapısında vakuolizasyon, spermatogonyumlarda azalma, primer spermatozoidlerde azalma, sekonder spermatozoidlerde artan doza bağlı olarak azalma, spermatozoidlerde kümelenme ve bağ doku yapısında kanlanma gözlenmiştir.

Endothall'in monoamin tuzu olan Hydrothol 191 (N, N- dimetilalkilamin) ile yapılan bir çalışmada *Lepomis macrochirus*de 112 gün boyunca 0.3 ppm doza maruz bırakılmıştır. Balığın solungaç, karaciğer, testis ve kan örneklerinde çalışılmış ve çalışma sonucunda morfolojik ve sistemik doku değişiklikleri olduğu gözlenmiştir. Solungaçta meydana gelen hasar 14. gün sonunda eski haline dönmeye başlamış

ancak 56. güne kadar karaciğer hasarı belirgin bir şekilde gözlenmiştir. 0.3 ppm ve 0.03 ppm hydrothol ile muamele edilmiş balık testislerinde de 3. günde hipertrofik hücreler olduğu ortaya çıkarılmıştır. 0.5 ppm hydrothol uygulanmış balıkta böbreğin kan damarlarında 36. güne kadar hasar gözlenmeye devam etmiştir [47]. Bizim çalışmamızda da 5 gün boyunca 0,1 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L endothalle maruz bırakılan zebra balığı (*Danio rerio*) testis dokularında belirgin hasarlar gözlenmiştir. Farklı pestisit türlerinin farklı balık testis dokusunda da benzer etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada *Heteropneustes fossilis* (Asya iğneli yayın balığı)'na 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda LAS maddesi (0.8 ml/L, 0.28 ml/L, 0.18 ml/L ve 0.3 ml/L) uygulanmış ve testis yapısının histopatolojisi incelenmiştir. 24 saat boyunca 0.48 ml/L LAS'a maruz kalan balığın testis dokularında kümelenme oluşumu, enflamatuar lezyonların görünümü ve belirgin olan spermatojenik hücrelerin bariz yoğunlaşması oldukça belirgindir. 48 saat 0.28 ml/L LAS'a maruz kalan balık testislerinde seminifer epitelde bozulma görülmüştür. Ayrıca daha düşük konsantrasyon olan 0.18 ml/L LAS'a 72 saat boyunca maruz kalan grupta bile enflamasyon ve spermatozoidlerde yoğunlaşmalar gözlenmiştir. Son olarak 96 saat boyunca 0.3 ml/L LAS maruziyeti sonucu elde edilen histopatolojik bulgular kontrol grubuna yakın olsada düşük dozda bile uzun süreli maruziyet sonucu spermatozoid hücrelerindeki yoğunlaşmanın arttığı gözlenmiştir [48]. Bizim çalışmamızla benzer olarak spermatozoid hücrelerinde kümelenme, seminifer tübül yapısının bozulması gözlenmiştir. Ayrıca farklı olarak seminifer tübüllerde birleşme ve spermatojenik hücre kümelerinde belirgin azalma gözlenmiştir.

Organoklorin pestisiti olan Endosülfan'ın Bluegill balığı testis dokusu üzerine etkileri incelenmiştir. 1 ve 2 haftalık periyot ve ayrıca 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca $1 \mu\text{g L}^{-1}$ doz ile aqua-toksik olan Endosülfan'a maruz kalan Bluegill balığının testis dokusunda hasarlar gözlenmiştir. 24 saat maruziyet sonucunda bağ dokusunda hafif parçalanmalar gözlenirken 48 saatlik maruziyet sonucunda primer spermatozoid zarının yırtılması ve seminifer tübüllerden ayrılması gözlenmiştir. 72 saatlik

maruziyet sonucunda bağ dokusu hasarının arttığı ve primer spermatositlerin lümenine göç ettiği gösterilmiştir. 96 saatlik maruziyet sonrasında ise ciddi bağ dokusu hasarı ve seminifer tübüllerin daha az belirgin olduğu tespit edilmiştir. 1 ve 2 haftalık maruziyet sonucunda seminifer tübüllerde bozulmalar, yer yer kaybolmalar ve testis yapısı kontrol grubuna kıyasla düzensiz olduğu belirtilmiştir [49]. Bizim çalışmamızda seminifer tübül yapısının bozulması ayrıca farklı olarak bağ dokuda kalınlaşma ve kanlanma gözlenmiştir.

Organoklorinli pestisitler grubuna giren Dikofol'un *Danio rerio* balığı testis dokusu üzerine etkileri incelenmiştir. Balıkların 15 litrelik akvaryumlarda uygulama grupları sırasıyla 1, 1.5, 3 mg/L dikofol'e maruz bırakılmıştır. Artan konsantrasyonda dikofol maruziyeti testisin genel histolojik yapısında bozulmalara ve olgunlaşan sperm sayısında azalmalara yol açtığı belirtilmiştir [50]. Bizim çalışmamızla kıyaslandığında 0,1 mg/lık doz grubunda sperm sayısında azalma gözlenirken diğer doz gruplarında sperm sayısında artış gözlenmiştir.

Nonester sentetik piretroit olan Etofenproksa ile yapılan çalışmada 8 µg/L konsantrasyona 48 saat ve 96 saat boyunca maruz bırakılan zebra balıklarından elde edilen testis dokuları incelenmiştir. Testis dokularında en çok rastlanılan histopatolojik bulgular sperm hücrelerinde azalma, leydig hücrelerinde hiperplazi ve dejenerasyondur. Bu bulgular 96 saat yüksek konsantrasyon grubu balıklarda görülmüştür. 48 saat düşük ve yüksek konsantrasyon ile 96 saat düşük konsantrasyon grubu balıklarda bu bulgulara rastlanılmamıştır [51]. Bizim çalışmamızla kıyaslandığında artan doz grubuna bağlı olarak seminifer tübül yapısında dejenerasyonlar gözlenmiştir.

Sonuç olarak elde edilen veriler baz alındığında endothallin zebra balığı testis dokusu üzerinde olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu maddenin özellikle sucul ekosisteme girmesiyle balıklarda üremeyi olumsuz yönde etkileyeceği gözlenmiştir. Endothal uygulanması sonucu seminifer tübül yapısında vakuolizasyon, seminifer tübül yapısının bozulması, spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatositlerde azalmalar, spermatogenik hücre kümelerinde belirgin azalma

spermatidde kümelenme, bağ dokuda kalınlaşma ve kanlanma, seminifer túbül yapısında birleşme görölmüştür. Bu histopatolojik etkiler göz önüne alındığında endothallin zebra balığı spermatogenezi engellediği ve üreme kapasitesini düşürdüğü belirlenmiştir. Bu çalışmanın bir sonucu olarak, endothallin diğer su organizmaları üzerinde bazı toksik etkilere neden olabileceği ve bu nedenle bu maddenin yer altı sularıyla karıştırılmasının sucul ekosistem için zararlı olduğu tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Carpio, Y., Estrada, M.P., Zebrafish as a genetic model organism. *Biotechnol. Appl.*,23: 4. 2006.
- [2] Akbulut, C., Bisfenol A'nın Zebra Balığı (*Danio rerio*) Primordial Germ Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin Histolojik ve Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- [3] Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling T.F., Stages Of Embryonic- Development Of The Zebrafish. *Developmental Dynamycs*, 203: 253-310, 1995.
- [4] Morris, J.A., Zebrafish: a model system to examine the neurodevelopmental basis of schizophrenia. *Progress in brain research*, 179, 97-106, 2009.
- [5] Moshal, K.S., Ferri-Lagneau, K.F., Leung, T., Zebrafish model: worth considering in defining tumor angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*, 20, 4, 114-119, 2010.
- [6] Şişman, T., İncekara, Ü., and Yıldız, Y.Ş., Determination of acute and early life stage toxicity of fatplant effluent using zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental toxicology*, 23 (4): 480-486, 2008.
- [7] Muto, A., Kawakami, K., Prey capture in zebrafish larvae serves as a model to study cognitive functions. *Frontiers in neural circuits*, 7, 110, 2013.
- [8] Newman, M., Ebrahimie, E., Lardelli, M., Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in genetics*, 5, 189, 2014.
- [9] Norton, W., Bally-Cuif, L., Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC neuroscience*, 11, 90, 2010.

- [10] Roberts, R. J., and Ellis, A. E. The anatomy and physiology of teleosts, In Fish Pathology (R. J. Roberts, ed.) Philadelphia, USA: W. B. Saunders, 3rd ed, pp. 12– 54, 2001.
- [11] Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nobrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W., Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction*, 81:1: 77-187, 2009.
- [12] Hess, R.A., França L.R., Structure of the Sertoli Cell In: Skinner MK, Griswold MD (eds), *Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press, 19-40, 2005.
- [13] De Rooij, D.G., Russell, L.D., All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21:776-798, 2000.
- [14] Ehmcke, J., Wistuba, J., Schlatt, S., Spermatogonial stem cells: questions, models and perspectives. *Hum Reprod Update* 12:275-282, 2006.
- [15] Pudney, J., Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell LD, Griswold MD (eds), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, 612-657, 1993.
- [16] Schulz, R.W., De Franca, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H. and Miura, T., Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165: 390–411, 2010.
- [17] Koç, N.D., Teksöz, N., Ural, M., ve Akbulut, C., Histological structure of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) testicles. *Elix.Aquac*, 46, 8117-8120, 2012.
- [18] Nobrega, R.H., Greebe, C.D., Van Der Kant, H., Bogerd, J., França, L.R., and Schulz, R.W., Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *Plos one* 5: e12808, 2010.
- [19] Schulz, R.W., and Nóbrega R.H., Regulation of spermatogenesis. In: Farrel A.P., (ed.), *Encyclopdia of fish physiology: from genome to environment*, volume 1: 627-634. San Diego: Academic Press, 2011.

- [20] Buitelaar, M.G., The role of IGF3 in zebrafish spermatogenesis. Utrecht University, Master's thesis, 2013.
- [21] Ware, G. W., Fundamentals of Pesticides. Thomson Publications, USA., 274 p, 1986.
- [22] Tanabe, S., Nishimura, A., Hanaoka, S., Yanagi, T., Takeoka, H., Tatsukawa, R., Persistent Organochlorines in Coastal Fronts Marina Pollutio Bulletin, 22 :7 pp.344-351, 1991.
- [23] Osibanjo, O., Bamgbose, O., Chlorinated Hydrocarbons in Marine Fish and Shellfish of Nigeria. Marine Pollution Bulletin, 21:12, pp. 581-586, 1990.
- [24] Rand, G.M., Petrocelli, S.R., Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and Applications, Hemisphere Publishing Cooperation, Washington, 666, 1985.
- [25] Chau, A.S.Y., Afghan, B.K, Analysis of Pesticides in Water. Vol I, II, III, CRC Pres Inc., Boca Raton, Florida, 1982.
- [26] Ribeiro, C.A.O., Vollaie, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides. PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France, Aquatic Toxicology, 1–17, 2005.
- [27] Siemering, G., David, N., Hay worth, J., Franz, A., Aquatic Pesticides Monitoring Program Literature Review. San Francisco Estuary Institute, California, 10-20, 35-45, 2005.
- [28] Öztürk, S., Özge, N., Bitki Koruma İlaçları. Eser yayıncılık, Ankara, 1978.
- [29] Canyurt, M. A., Tarımda pestisit kullanımının su ürünleri üzerine etkileri-kıyı sorunları ve çevre sempozyumu. Belediye Yayınları, Kuşadası, 1994.
- [30] Yanık, T., Atamanalp, M., Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Su Kirliliğine Giriş. Atatürk Üniv., Ziraat Fak., Ders Yay. No: 226, Erzurum, 2001.
- [31] Güncan A., Herbisitlerin Canlılar Aleminde Yan Etkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 8, Sayı 2-3, 1977.

- [32] Henderson, A.M., Gervais, J.A., Luukinen, B., Buhl, K., Stone, D., Glyphosate General Fact Sheet; National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services, 2010.
- [33] Solomon, K.R., Dalhoff, K., Volz, D., Kraak, G.V.D., Effects of Herbicides on Fish. Fish Physiology, Volume 33, 2014.
- [34] Tiryaki, O., Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 26(2): 154169, 2010.
- [35] Ameal, J.J., Axler, R.P., Owen, C.J., Johnson, K.E., and Guyton, B., The determination of Hydrothol 191 (amine salt of endothall) in eutrophic wastewater ponds. Chemosphere, 34:3, 641-654, 1997.
- [36] Wells, R.D.S., and Clayton, J.S., Evaluation of endothall for aquatic weed control in New Zealand. Proc. 46th NZ Plant Protection Conf. pp. 102-106, 1993.
- [37] Crafts, A.S., The Chemistry and Mode of Action of Herbicides. Interscience Publishers, Inc. 250 Fifth Avenue, New York 1, N.Y., 1961.
- [38] Herbicide Risk Assessment for the Aquatic Plant Management Final Supplemental Environmental Impact Statement.
- [39] Von Bruchhausen F., and Bersch H.W., Constitution of cantharidin. Arch. Pharm., 266: 697-702, 1929.
- [40] Mann, J.D., and Pu, M., Inhibition of Lipid Synthesis in Certain Herbicides. Weed Science, 16:197-198, 1968.
- [41] T.C. Çevre ve orman bakanlığı devlet su işleri genel müdürlüğü, İşletme ve bakım dairesi başkanlığı, Su yabancı otları, Anlara, 2009.
- [42] Simsiman, G., Chesters, G., Persistence of endothall in the aquatic environment. Water Air Soil Pollut, 402-406, 1975.
- [43] Mills, D., Akvaryum Bakımı. Çevirenler Eshar Kütevin ve Ziya Kütevin, (1994), İnkılap Kitapevi, İstanbul, 975-10-0641-4, 1986.
- [44] Timur, M., Balık Fizyolojisi. Nobel Yayın Dağıtım No:957, 2006.

- [45] Wixon, J., Featured organism: *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17, 3: 225231, 2000.
- [46] Westerfield, M., *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. University of Oregon Press, Eugene, pp. 1.1–1.27, 1995.
- [47] Eller, L.L., Pathology in redear sunfish exposed to Hydrothol 191. *Transactions of the American Fisheries Society*, 98:1, 52-59, 1969.
- [48] Kumar, M., Trivedi, S. P., Misra, A., & Sharma, S. Histopathological changes in testis of the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch) exposed to linear alkyl benzene sulphonate (LAS). *Journal of environmental biology*, 28:3, 679684, 2007.
- [49] Dutta, H. M., Misquitta, D., & Khan, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 51:1, 149-156, 2006.
- [50] Gökçe, B., Muşmula, O., & Üçüncü, S. İ. The effects of Dicofol on Thyroid Gland of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Teleostei). 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye 03–07 Eylül 2012
- [51] Ağırbaşı, N., Çevresel Kirlenici Etofenproksun Zebra Balıklarında (*Danio rerio*) Genotoksik ve Histopatolojik Etkilerinin Belirlenmesi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2016

ÖZGEÇMİŞ

Zeynep İŞEL, 12.08.1990 tarihinde İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. 2008 yılında Marmara Lisesi'nden mezun oldu. 2011 yılında başladığı Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2015 yılında bitirdi. 2015 yılında Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı.