

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MANCOZEB MADDESİNİN ZEBRA BALIĞININ
(*Danio rerio*) TESTİS DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve ABAR GÜROL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

Haziran 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MANCOZEB MADDESİNİN ZEBRA BALIĞININ
(*Danio rerio*) TESTİS DOKUSU ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MERVE ABAR GÜROL

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 12/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Figen Esin
KAYHAN
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Tuğba ONGUN
SEVİNDİK
Üye



Doç. Dr. Nazan Deniz
YÖNER
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.



Merve ABAR GÜROL
12 /06/2019

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmam sırasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerinden ve deneyimlerinden yararlandığım, araştırmanın planlanmasından yazılmasına kadar tüm aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, teşvik eden, aynı titizlikte beni yönlendiren ve her konuda tüm desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen başta değerli danışman hocam Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ'a teşekkürlerimi borç bilirim. Aynı zamanda her zaman her anlamda yanımda olan, bu araştırmanın tüm aşamalarında yardımcı olan, yol gösteren değerli Arş. Gör. Dr. Cansu AKBULUT hocama teşekkür ederim.

En büyük destek kaynağım olan eşim Mehmet GÜROL başta olmak üzere her daim yanımda olup bana destek veren aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEŞEKKÜR..... | i |
| İÇİNDEKİLER..... | ii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... | iv |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | v |
| TABLolar LİSTESİ..... | vii |
| ÖZET | viii |
| SUMMARY..... | ix |
| BÖLÜM 1. | |
| GİRİŞ..... | 1 |
| BÖLÜM 2. | |
| KAYNAK ARAŞTIRMASI..... | 3 |
| 2.1. Model Organizmalar..... | 3 |
| 2.1.1. Model organizmaların seçimi..... | 4 |
| 2.1.2. Sucul model organizmalar..... | 4 |
| 2.2. Zebra Balığının Genel Özellikleri | 5 |
| 2.2.1. Zebra balığının biyolojisi ve morfolojisi..... | 5 |
| 2.2.2. Zebra balığının testis yapısı ve histolojisi..... | 7 |
| 2.3. Pestisitler | 10 |
| 2.3.1. Pestisit tanımı ve pestisitlerin genel özellikleri..... | 10 |
| 2.3.2. Pestisitlerin sınıflandırılması..... | 14 |
| 2.3.3. Mancozeb | 16 |
| BÖLÜM 3. | |
| MATERYAL, YÖNTEM..... | 18 |
| 3.1. Materyal..... | 18 |
| 3.1.1. Zebra balığı | 18 |
| 3.1.2. Ortam koşulları..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2. Yöntem | 19 |
| 3.2.1. Testis dokularının histolojik incelenmesi..... | 19 |
| 3.2.1.1.Fiksasyon (tespit etme) | 19 |
| 3.2.1.2. Dehidrasyon | 20 |
| 3.2.1.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme | 21 |
| 3.2.1.4. Kesit alma | 21 |
| 3.2.1.5. Boyama ve inceleme..... | 21 |
| | |
| BÖLÜM 4. | |
| ARAŞTIRMA BULGULARI..... | 22 |
| 4.1. Kontrol Grubu | 22 |
| 4.2. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanan Grup..... | 24 |
| 4.3. 7,5 pm Mancozeb Maddesi Uygulanan Grup..... | 27 |
| | |
| BÖLÜM 5. | |
| TARTIŞMA VE SONUÇ | 31 |
| | |
| KAYNAKLAR | 36 |
| ÖZGEÇMİŞ | 41 |

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

| | |
|--------------------|--|
| μm | : Mikrometre |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Santigrat |
| AB | : Avrupa Birliği |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| BD | : Bağ doku |
| BL | : Bazal lamina |
| Cm | : Santimetre |
| Dk | : Dakika |
| EBDC | : Etilen bisditiyokarbamat |
| ETÜ | : Etilen tiyoüre |
| FAO | : Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü |
| Gr | : Gram |
| L | : Leyding hücresi |
| mL | : Mililitre |
| ppm | : Milyonda bir |
| PS | : Primer spermatozoid |
| S | : Sperm |
| SEM. TB. | : Seminifer tübül |
| SG | : Spermatogonyum |
| SK | : Sekonder spermatozoid |
| Sn | : Saniye |
| ST | : Spermatit |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Dişi zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) | 6 |
| Şekil 2.2. Erkek zebra balığı (<i>Danio rerio</i>) | 6 |
| Şekil 2.3. Zebra balığı testis dokusu hücreleri | 9 |
| Şekil 2.4. Zebra balığı testis dokusunda sertoli hücreleri, leydig hücreleri..... | 9 |
| Şekil 2.5. Seminifer tübüldeki hücreler | 10 |
| Şekil 2.6. Pestisitlerin doğadaki dönüşümleri | 13 |
| Şekil 2.7. Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması | 14 |
| Şekil 2.8. İçerdikleri etkin maddelerin özelliklerine göre pestisit türleri | 15 |
| Şekil 2.9. Mancozebin kimyasal yapısı | 17 |
| Şekil 4.1. Kontrol grubu; seminifer tübüller içerisindeki sperm hücreleri | 22 |
| Şekil 4.2.Kontrol grubu; seminifer tübüller içerisindeki spermatogenik hücre kümeleri | 23 |
| Şekil 4.3. Kontrol grubu; seminifer tübüller içerisindeki spermatogenik hücre kümeleri | 23 |
| Şekil 4.4. Kontrol grubu; seminifer tübüller içerisindeki spermatogenik hücre kümeleri | 24 |
| Şekil 4.5. 5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup; zebra balığının seminifer tübüllerindeki ikili birleşmeler, spermatit hücrelerinde azalma, sperm sayılarında artış | 25 |
| Şekil 4.6. 5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup; zebra balığının spermalarında ve spermatogenik hücre gruplarında meydana gelen vakualizasyon, spermatit sayısında azalma, sperm hücrelerinde artış... .. | 25 |
| Şekil 4.7. 5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup; zebra balığının spermalarında meydana gelen vakualizasyon, seminifer tübüllerde açıklık, tübüllerdeki dejenerasyonlar, bağ dokusunda artış..... | 26 |
| Şekil 4.8. 5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: zebra balığında meydana | |

| | |
|---|----|
| gelen seminifer túbüllerdeki açıklık, bazal lamina incilmesi, bağ dokusunda artış | 26 |
| Şekil 4.9. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: zebra balığına meydana gelen spermatogenik hücre gruplarındaki ayrılmalar, seminifer túbüllerdeki ikili birleşme, túbüllerdeki açıklık, sperm hücrelerindeki artış, spermatogonyum hücresinde azalış, seminifer túbüllerde dejenerasyon..... | 27 |
| Şekil 4.10. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: seminifer túbüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının azalması, túbüller içerisinde sadece sperm hücrelerinin gözlenmesi, sperm hücrelerindeki artış | 28 |
| Şekil 4.11. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: zebra balığına meydana gelen seminifer túbüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının ayrılması, bazal laminanın incelmeye başlaması, spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyon, túbüllerde açıklık ... | 28 |
| Şekil 4.12. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: leyding hücresindeki vakualizasyon..... | 29 |
| Şekil 4.13. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: spermlerdeki vakualizasyon, bağ dokusunun kaybolmaya başlaması, seminifer túbüllerde ikili birleşme..... | 29 |
| Şekil 4.14 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup; spermatogenik hücre gruplarındaki ayrılmalar, spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyon, seminifer túbüllerdeki üçlü birleşme..... | 30 |
| Şekil 4.15. 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış grup: zebra balığına meydana gelen spermatogenik hücre gruplarındaki ayrılmalar, seminifer túbüllerdeki üçlü birleşme, seminifer túbüllerdeki açıklık, sperm hücrelerindeki artış, seminifer túbüllerde dejenerasyon..... | 30 |

TABLolar

| | |
|--|----|
| Tablo 2.1. Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımları..... | 5 |
| Tablo 3.1. %10'luk nötral formaldehit hazırlanışı..... | 20 |
| Tablo 3.2. Işık mikroskobu için dehidrasyon uygulaması..... | 20 |
| Tablo 3.3. Hematoksilen-eozin boyama yöntemi..... | 21 |

ÖZET

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı (*Danio rerio*), mancozeb, testis

Sentetik bir pestisit olan mancozeb 1967 yılından itibaren kullanılmakta, mantarların büyümesini engellemekte ve bitkileri hasarlara karşı korumaktadır. Bitkileri hasarlara karşı korumasına rağmen maternal toksisiteye, embriyo toksisite ve karakteristik teratojenik etkilere neden olmaktadır. Yaptığımız çalışmada Mancozeb'in Zebra balıklarındaki (*Danio rerio*) testis dokularına akut etkisi incelenmiştir.

Zebra balıkları Mancozeb'in farklı dozlarına (5 ppm, 7,5 ppm) maruz bırakılmış ve histopatolojik değişiklikleri gözlenmiştir. Bir kontrol grubu ve 2 deney grubu oluşturulmuş zebra balıkları 5. gün sonunda disekte edilmiş ve testis dokularındaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Kontrol grubu histopatolojik olarak normal gözlenirken, doza maruz kalan bireylerde genel olarak seminifer tübüllerde dejenerasyonlar, seminifer tübül şeklinde bozulmalar tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerde ikili ve üçlü birleşmeler görülmüştür ve tübül yapılarında bariz bir şekilde açıklıklar izlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sperm hücre sayısında artış gözlenmiştir. Leyding hücrelerinde, sperm hücrelerinde ve spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyonlar görülmüştür. Spermatogenik hücre gruplarında yapısal bütünlüğün bozulduğu ve tübül yapılarının sadece spermler ile dolu olduğu izlenmiştir.

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE TESTIS TISSUE OF THE ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AFTER EXPOSURE TO MANCOZEB

SUMMARY

Keywords: Zebrafish (*Danio rerio*), mancozeb, testis

Used from a synthetic pesticide mancozeb in 1967, is still hinder the growth of fungi and plants against damage. Although the protection of plants against damage to maternal toxicity, embryo toxicity and characteristics cause teratogenic effects. Our studies of mancozeb in the zebrafish (*Danio rerio*) examined the acute effects of the testes tissue.

Zebrafish were exposed to different doses of Mancozeb (5 ppm, 7.5 ppm) and histopathological changes were observed. 1 control group and 2 experimental group were formed, the zebrafish were dissected at the end of the 5 th day and histopathological changes in the testes were examined under light microscope. While the control group was observed as normal histopathologically, degenerations in seminiferous tubules and disturbances in the form of seminiferous tubules were detected in individuals exposed to the dose. Double and triple combinations were observed in the seminiferous tubules and the openings were clearly observed in the tubular structures. When compared with the control group, increase in the number of sperm cells were observed. Vacuolization were seen in Leyding cells, sperm cells and spermatogenic cell groups. It was observed that structural integrity was deteriorated in spermatogenic cell groups and tubular structures were only filled with sperm.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Pestisitler, günümüzde modern tarım uygulamalarının vazgeçilmez bir parçasıdır ve gıda üretiminin artırılmasında hayati faktörlerden biri olarak rol oynar. Pestisit kullanımı tarımsal olan ürünü hastalık, zararlı ve yabancı otların zararlarından koruyabilmek, kaliteli üretimi sağlayabilmek için kullanılan bir tarımsal mücadele şeklidir. Etki süresinin kısa olması ve kullanımlarının kolay olmasından dolayı pestisitler en çok tercih edilen yöntemlerdir.

Ancak pestisitler endokrin sistemini bozabilir ve hayvan gelişiminin gerilemesine neden olabilir. Büyük bir olasılıkla insanlar içinde bazı pestisitler steroid metabolizmasını bozabilir (Lone ve ark., 2014). Bunun yanında bir bitkiye uygulandıklarında sadece o bitki yüzeyinde ya da yapısında kalmazlar farklı yollarla doğaya bulaşırlar. Pestisitler özelliklerine göre buharlaşarak, rüzgârla taşınarak, yağmurla birlikte yer altı sularına ya da yüzey sularına karışarak sadece uygulandığı bölgeye değil, çok daha uzak mesafelere taşınabilirler. Pestisitlerin doğaya yayılmaları ve kalıcılıkları ışık, su, ortamın asitliği ya da toprağın özelliklerine bağlı olarak değişebilmektedir. Çok hızlı bir şekilde bozunabilirler ya da tam tersi kalıcılıkları daha da artabilmektedir (Karakoç ve Nakiboğlu, 2010).

Mancozeb, [[1,2-etandil bis [carbamodithioate]](2)] manganez bir mantar öldürücü, karbamat alt sınıfı ditiokarbamattır. Bir birçok meyveyi, fındığı ve tarla bitkilerini mantar hastalıklarından korumak için kullanılır. Geniş spektrumlu olan birincil metaboliti ethylenethiourea (ETÜ), tiroide neden olur. Toprakta ETÜ etkisi 5-10 hafta devam etmektedir. Bu ditiyokarbamat, ağırlıklı olarak tarımda kullanılır (Srivastava ve Singh, 2013).

Zebra balıkları (*Danio rerio*) ekotoksikoloji çalışmalarında çok sık kullanılmaktadır. Zebra balıkları (*Danio rerio*) dayanıklı bir türdür, kolaylıkla bulunur, laboratuvar ortamında kolay beslenir ve kolaylıkla çoğalır (ergin dişiler haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakabilirler), dış döllenme ile ürerler, jenerasyon süreleri kısadır ve toksik ajanlara embriyoları duyarlıdır. Zebra balıklarının (*Danio rerio*) yumurta ve embriyoları saydamdır bu sayede yumurta ve larva gelişimlerini gözlemek kolaylaşır. Bu nedenlerden dolayı zebra balıkları araştırmalarda çok sık tercih edilmektedirler (Kimmel ve ark., 1995; Lele ve Krone, 1996). Bunun yanında son zamanlarda Zebra balığı (*Danio rerio*) insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında model organizma olarak kullanılmaktadır. Bunun nedenleri, Zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olmasıdır. En önemlisi ise insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin (sitokrom P450 grubu) Zebra balığında da (*Danio rerio*) keşfedilmiş olmasıdır (Şişman ve Geyikoğlu, 2010).

Balıklar suda çözünen farklı toksik maddeleri alabilir ve bünyelerinde tutabilirler. Sucul ortamlardaki öldürücü olmayan pestisit konsantrasyonları bu sucul organizmalarda yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır ve bu değişiklikler ölüm oranlarından daha da fazladır (Sancho ve ark., 2003).

Yapılan bu araştırmada bir pestisit türü olan Mancozeb'in Zebra balıklarının (*Danio rerio*) testis dokusu üzerine göstermiş olduğu histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Model Organizmalar

Model organizmalar dünyadaki canlıların küçük bir kısmını oluşturur. Geçmişten günümüze bilim adamları genetik ve gelişim üzerinde yaptıkları deneysel çalışmalarda model organizmalar üzerinde yoğunlaşmışlardır (Hedges, 2002). Son zamanlarda model organizmalarla ilgili çalışmalar çoğalmış ve farklı türlerde uygulamalar yapılmaya başlanmıştır. Önceden küçük boyutlu, jenerasyon süresi kısa canlılar model organizma olarak kullanılırken son yıllarda genom dizilimlerinin belirlenmesine yönelik projelerin artmasıyla farklı özelliklere sahip canlıların da model organizma olarak kullanılabilirliği fikri ortaya çıkmıştır. Örneğin, araştırmacılar deneysel çalışmalarda kullanılabilirliğinden ziyade canlıda bulunan türe özgü bir genoma sahip olmasından dolayı kaplan balon balığı (*Takifugu rubripes*) türü üzerinde yoğunlaşmışlardır (Brenner ve ark., 1993). Model organizmalar 3 grup altında toplanabilir. Bunlar; Genetik Model Organizmalar, Deneysel Model Organizmalar ve Genomik Model Organizmalardır. Genetik model organizmalar grubunda en sık kullanılan organizmalara *Saccharomyces cerevisiae* (Fungus), *Drosophila melanogaster* (Sirke sineği) ve *Caenorhabditis elegans* (Nematod) türleri örnek verilebilir. Deneysel model organizmalara ise deneysel süreleri uzun ve zayıf genetik haritaya sahip bazı türler örnek verilebilir. Bunlar, *Gallus gallus* (Tavuk) ve *Xenopus laevis* (Kurbağa) olabilir. Genomik model organizmalar grubunda ise genom kalitelerinin uygunluğu nedeniyle *Danio rerio* (Zebra balığı), *Fugu brripes* (Şişen balık) ve *Oryzias latipes* (Medaka) sıklıkla kullanılır. Zebra balığı Güney Asya, Kuzey Hindistan ve Pakistan'da doğal sularda ve pirinç tarlalarında yaşayan tropikal bir tatlı su balığıdır. Kemikli balıkların (Teleostei), Actinopterygii (Işımsal yüzgeçliler) sınıfından, Sazangiller (*Cyprinidae*) familyasına ait bir türdür. Boyu 4-6 cm arasında olan çok hareketli ve barışçıl bir balıktır (Ertuğ ve ark., 2015). Bazı çalışmalarda da model organizma olarak tarımsal

bir ürün olan çeltik kullanılmıştır. Bütün bu türlerin hepsi model organizma grubu içerisinde yerini almıştır (Hedges, 2002).

D. melanogaster memeli olmayan geçen yüzyılda tıp ve biyoloji alanlarında kullanılan en önemli bir model organizmadır. Son zamanlarda yapılan bir çok araştırma, insan hastalıklarında *D. Melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını destekler. Bir kimyasalın genotoksik etkisini bir canlıda belirlemede kullanılan testlerde sirke veya meyve sineği olarak bilinen *D. melanogaster* en sık kullanılan bir model organizmadır (Müller, 1927).

2.1.1. Model organizmaların seçimi

Çalışmalarda kullanılacak model organizmalar seçilirken çeşitli faktörler göz önüne alınmaktadır. Bu faktörler şu şekilde sıralanabilir:

- İnsan genomu ile homolojisinin yüksek olması
- Jenerasyonlar arası sürenin kısa olması
- Embriyonik gelişiminin kolayca izlenebilmesi ve müdahale edilebilirliği
- Kolay kültüre alınması
- Deney manipulasyonlarına uygun olması
- Genetik analizlere uygun olması
- Etik açıdan fazla sorun oluşturmamaları (Kutluyer ve Aksakal, 2013).

2.1.2. Sucul model organizmalar

Genomik model organizma olarak en çok kullanılan balık türleri Zebra (*Danio rerio*), Medaka (*Oryzias latipes*) ve Balon balığı (Şişen balık) (*Fuguru bripes*)'dir. Bu türlerin dışında ayrıca Gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), Tilapia (*O. niloticus*) ve Su piresi (*Daphnia pulex*) de model organizma olarak kullanılmaktadırlar (Erdoğan ve Aksakal, 2008). Bu organizmalar; yetiştirme şartlarının kolay olması, jenerasyon arasının kısa olması, genom büyüklüğünün kısa olması gibi sebeplerden dolayı transgenik çalışmalarda, hastalıkların teşhis edilmesi

ve tedavisinde model organizma olarak kullanılmaktadırlar (Tablo 2.1.) (Erdoğan ve Aksakal, 2008).

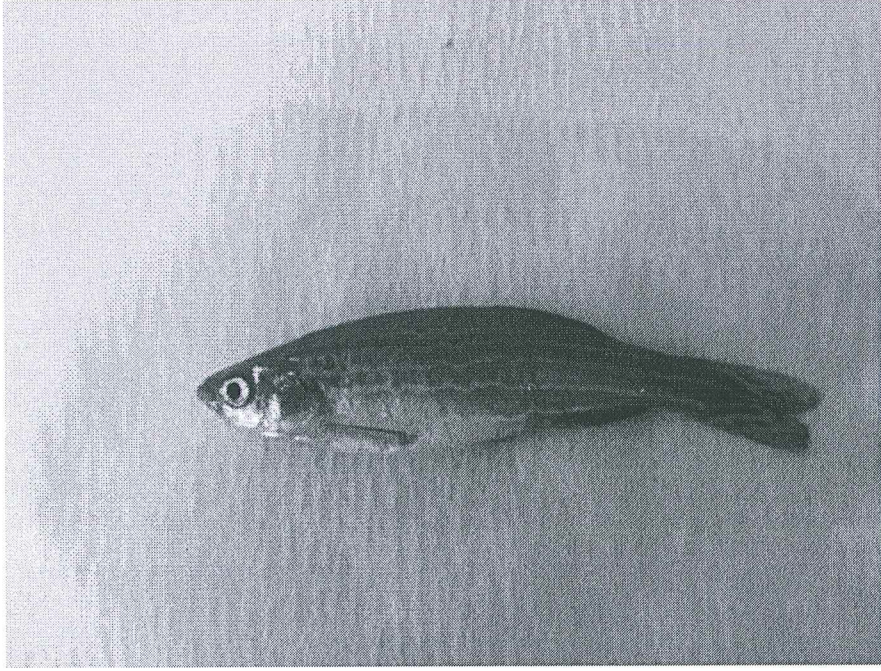
Tablo 2.2. Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımları (Kutluyer ve Aksakal, 2013)

| Sucul model organizmalar | Deneysel avantajları | Kullanım amaçları |
|---|--|---|
| Zebrafish (<i>Danio rerio</i>) | Tüm embriyo gelişim safhalarının izlenmesi ve değiştirilebilmesi, embriyo gelişimi hızlı, organizasyonu basit ve şeffaf, gen transfer teknolojileri gelişmiş, genetik analizlere uygun, birçok insan hastalık ve gelişim genlerinin benzerine sahip (Gilmour ve ark., 2002; Dahm, 2002; Brand ve ark., 2002; Ma ve ark., 2003; Carpio ve Estrada, 2006) | Transplantasyon ve mikroenjeksiyon çalışmalarında |
| Medakafish (<i>Oryzias latipes</i>) | Tüm embriyo gelişim safhalarının izlenmesi, üremesi kolay, jenerasyon süresi kısa (Maier ve ark., 1993; Himmelbauer, 1998; Wittbrodt ve ark., 2002) | Transplantasyon ve mikroenjeksiyon çalışmalarında |
| Balon balığı (Şişen balık) (<i>Fugu bripes</i>) | Omurgalılar içerisinde en küçük genoma sahip, genomlarının küçük olması nedeniyle genlerin tespiti ve analizi kolay (Brenner ve ark., 1993; Crnogorac-Jurcevic ve ark., 1997; Yamanoue ve ark., 2009; Uji ve ark., 2011) | Transplantasyon ve mikroenjeksiyon çalışmalarında |

2.2. Zebra Balığının Genel Özellikleri

2.2.1. Zebra balığının biyolojisi ve morfolojisi

Zebra balığı, doğal olarak Güney Asya, Kuzey Hindistan, Pakistan, Bhutan ve Nepal gibi ülkelerdeki akarsularda yaşayan tropikal bir tatlı su balığıdır. Kemikli balıkların (Teleostei) Actinopterygii sınıfında bulunan *Cyprinidae* familyasına ait bir tür olarak bilinir (Carpio ve Estrada, 2006). Genel olarak durgun, temiz ve oksijeni bol sularda yaşarlar. Gövdelerinde 7-9 adet gümüş ve mavi rengi çizgiler vardır. Ergin bireylerinin boyu 5-6 cm'dir. Dişilerin karınları şişkin ve erkeklerden iridir. Erkekler ince ve düz bir yapıya sahiptir (Şekil 2.1.). Zebra balıkları çok hareketli balıklardır ve sürü halinde yaşamlarını sürdürürler. Zebra balıkları 18-30 °C su sıcaklığı aralığında bir sorun olmadan hayatını sürdürebilmektedirler. Zebra balıklarının üremeleri çok kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28 °C'dir (Akbulut, 2012).



Şekil 2.1. Dişi Zebra balığı (*Danio rerio*)



Şekil 2.2. Erkek Zebra balığı (*Danio rerio*)

Zebra balığı (*Danio rerio*), embriyo gelişimindeki genetik kontrolünün kolay olması ve deneysel çalışmalardaki avantajlarından dolayı son yıllarda biyologlar tarafından

tercih edilen bir model organizma haline gelmiştir (Carpio ve Estrada, 2006). Zebra balıkları genetik çalışmalar için çeşitli avantajlara sahiptirler. Yüksek orandaki döl verimi ile gelişim hızının yanı sıra mutasyonlar sperm örneklerinde korunabilir ve in vitro döllenede kullanılabilir. Üretilen mutant zebra balıkları insan hastalıklarını incelemek için uygun bir modeldir. Farmakolojik çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadırlar (Ma ve ark., 2003). Seçilen bireylerden sabit ve fazla sayıda yumurta elde edilmesi yeni genlerin tanımlanmasında ve bu genlerin fonksiyonlarının keşfedilmesi, zebra balığının büyük ölçekli genetik çalışmalar için ideal bir tür olmasına neden olmuştur (Pelegri, 2002). Bu balığın üretimi oldukça kolaydır ve gelişim süreçleri hızlıdır. Mikroenjeksiyon, hücre transplantasyonu gibi deneysel manipülasyonlara karşı dayanıklı bir canlıdır (Gilmour ve ark., 2002). Embriyogenez yaklaşık 24 saat içinde olur ve 5 gün içinde organ oluşumu büyük ölçüde tamamlanır. Bu yüzden deneylerin tamamlanması ve embriyo üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi kolaydır (Dahm, 2002). Diğer model organizmalarla karşılaştırıldığı zaman, zebra balığında yüksek döl verimi ile karşılaşırız. En uygun şartlarda, bir dişi haftada 200 yumurta üretir. Laboratuvar koşulları altında ise yıl boyunca yumurtlayabilir (Brand ve ark., 2002).

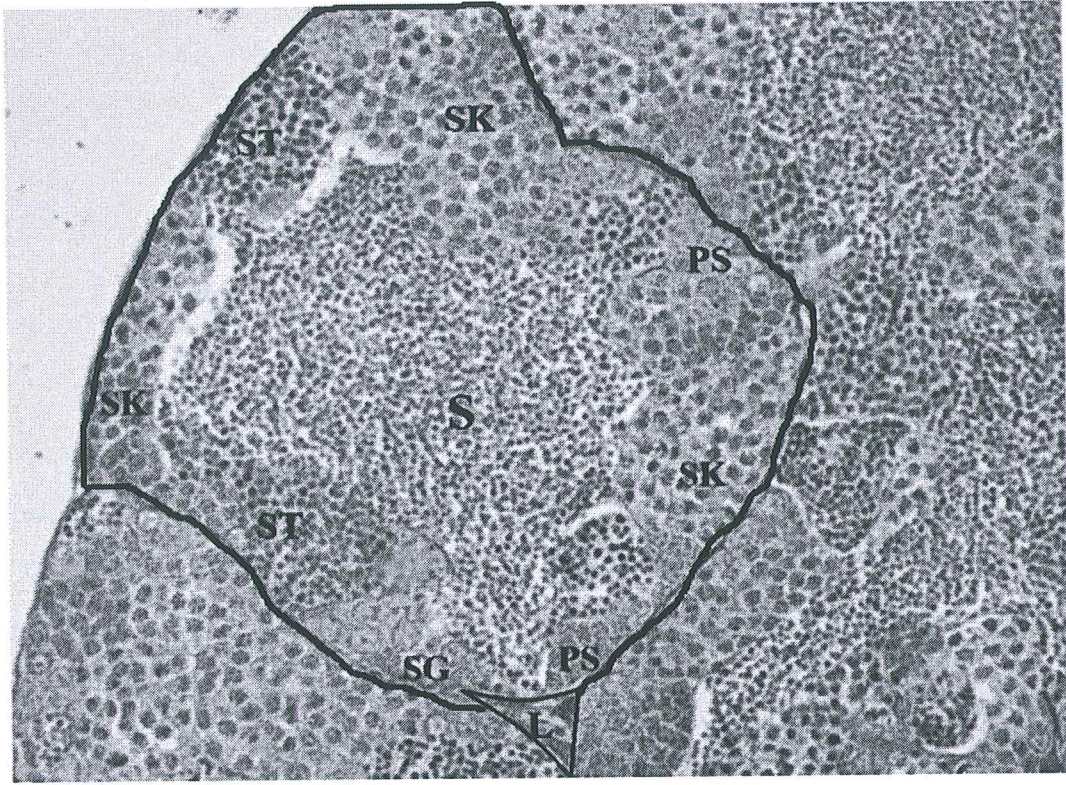
2.2.2.Zebra balığının testis yapısı ve histolojisi

Erkek üreme hücrelerinin bulunduğu, testesteron hormonunun üretildiği yer testis dokusudur. Testis dokusu seminifer tübüllerden ve bu tübüllerin etrafında yer alan bağ dokusundan oluşmaktadır. Bu tübüller içinde spermatogenez olayı gerçekleşmektedir. İntertübüler aralıkta yer alan Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) ise testesteron hormonunu sentezler (Kierszenbaum, 2006).

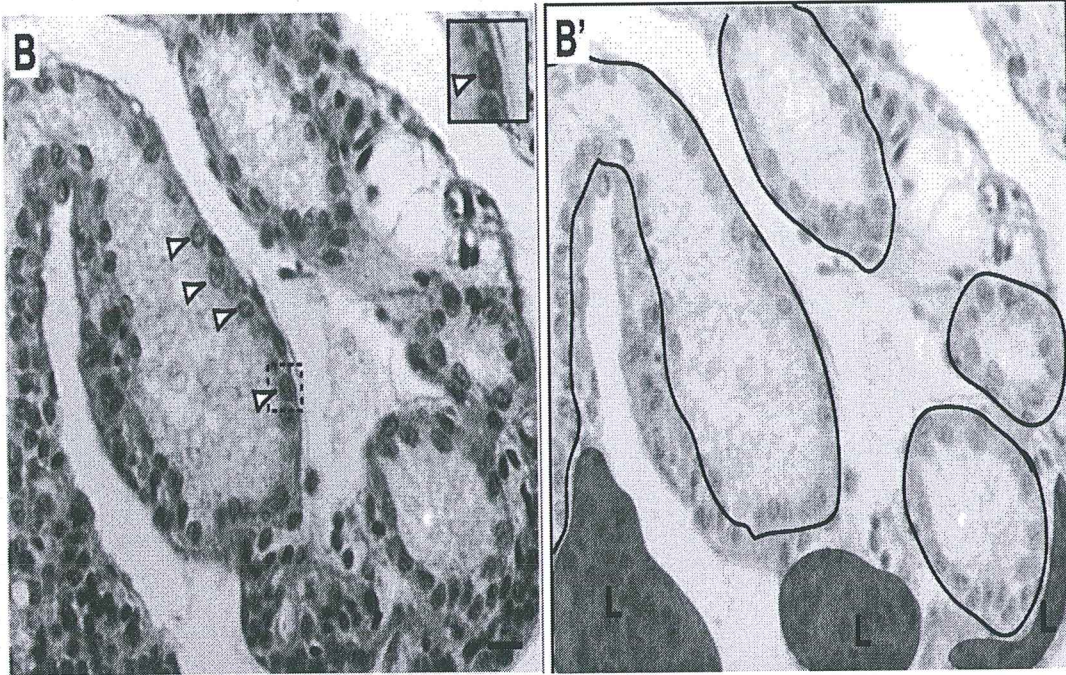
Zebra balığı testislerinin, periton duvarı ile çevrili tübül içerisinde spermatogenez hücrelerinden oluştuğu görülmektedir (Roberts ve Ellis, 2001). Bu tübüller, Sertoli hücreleri adı verilen somatik destek hücreleri tarafından çevrelenmiştir (Siegfried ve Volhard, 2008). Histolojik yapısı içerisinde seminifer tübüller, testiyoller, bağ dokular, seminifer tübüllerde spermatogenez hücreleri (spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid, sperm) ve Leydig hücreleri

bulunmaktadır. Seminifer túbüller arasında bağ dokusu görölür. Spermatogenezin aşamaları mayoz ve spermiyogenezdir. Bunlara ait tüm hücre grupları seminifer túbüllerde farklı gruplar olarak görölür. Seminifer túbüller ile hücreler arasındaki bağ dokusu spermatogenez fazında görölür. Spermatogonyum hücreleri bu aşamada tespit edilmiştir. Tespit edilen spermatogonyumlar büyük, soluk renkli, sitoplâzmaları homojen ve büyük çekirdekli hücre gruplarıdır. Belirsiz çekirdekli olanların spermatogonyum-A olduğu tespit edilmiştir. Koyu ve berrak çekirdekli olanlar spermatogonyum-B hücreleridir. Spermatogonyumlar mitotik bölünerek spermatozoidlere dönüştür.

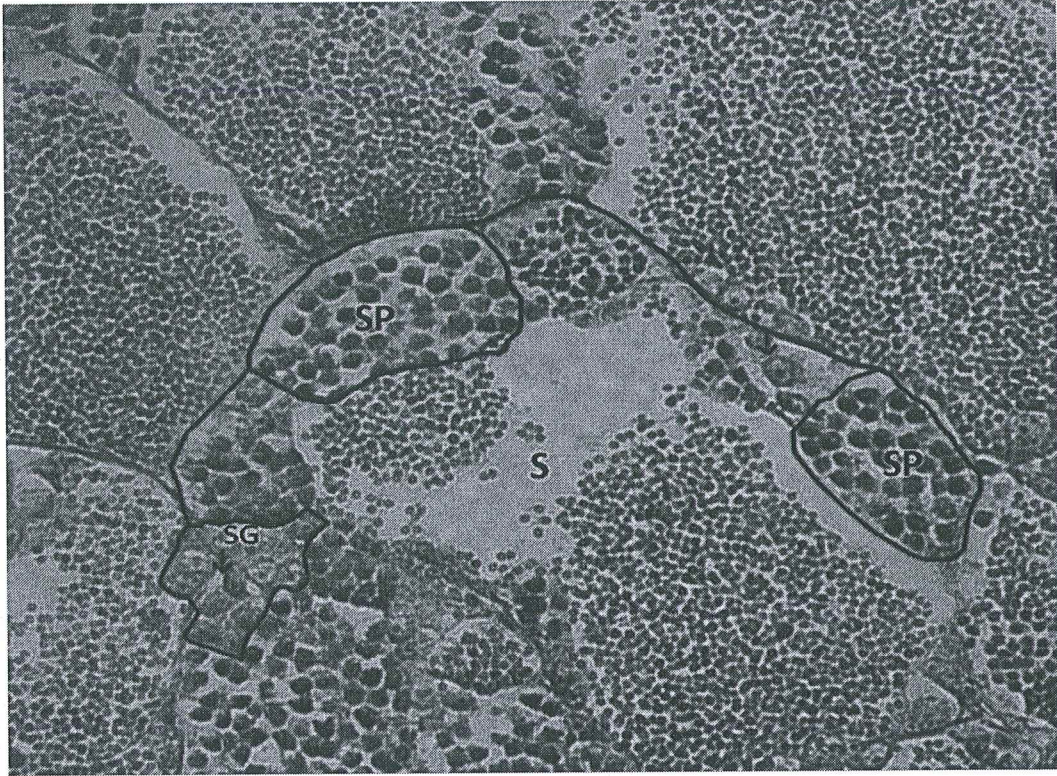
Histolojik kesitlerde spermatozoid hücreleri spermatogonyumlardan daha küçüktür ve daha yoğun sitoplazmaya sahiptir. Mayoz aşamasında spermatozoid hücrelerinin primer ve sekonder spermatozoid olarak ikiye ayrıldığı belirlenmiştir. Primer spermatozoid hücrelerinin oval ve yoğun sitoplazmaya sahip olduğu görölmüştür. Mayozun ilk aşamasında primer spermatozoidlerin belirsiz hücre çekirdekli yoğun kromatinlerle kaplı olduğu görölmüştür buna rağmen sekonder spermatozoidler primer spermatozoidlerle benzer şekilde, onlardan daha küçük ve daha yuvarlaktır. Ve ayrıca tespit edilmiştir ki spermatozoidler seminifer túbül içindeki en küçük ve en yuvarlak sekonder spermatozoidlerin mayozundan oluşmaktadır. Son aşama olan spermiyogenez aşamasında spermatozoidlerin küçüldüğu ve kuyruk benzeri yapıya sahip olduğu görölmüştür. Spermiler dışındaki tüm spermatogenez hücrelerinin, genellikle seminifer túbülün bazal kısmında bulunduğu belirlenirken; spermiler seminifer túbüllerin lümeninde bulunur. Leyding hücreleri, seminifer túbüllerdeki dokuların birleştirilmesinde görölmüştür (Koç ve ark., 2012).



Şekil 2.3. Zebra balığı testis dokusu: Testis dokusu bazal membranla çevrili tüplerde görülür (siyah renk ile çizilmiştir), seminifer tübüller içerisindeki spermatogonik hücre kümeleri; Spermatogonyum hücreleri (SG), Primer spermatositler (PS), Sekonder spermatositler (SK), Spermatidler (ST), Sperm hücreleri (S), Leydig hücreleri (L), H&E Boyama, x40



Şekil 2.4. Zebra balığı testis dokusu: Sertoli hücreleri (ok uçları ile gösterilmiştir B), Leydig hücreleri (L) (B'), Ölçek çubuğu 10 mikron (B), H&E boyama (Siegfried ve Volhard, 2008)



Şekil 2.5.Seminifer tübüldeki hücreler; spermtogonyum (SG), spermatosit hücreleri (SP), sperm hücreleri (S), B tipi spermatogonium hücreleri (okile gösterilen), H.E boyama, x40 (Koç ve ark., 2012)

2.3. Pestisitler

2.3.1. Pestisit tanımı ve pestisitlerin genel özellikleri

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde artmasıyla birlikte tarım ürünlerine duyulan ihtiyaç da fazlasıyla artmaktadır (Ni ve ark., 2004). Ancak tarım arazileri yazlıklar, fabrikalar, otoyollar, yerleşimler gibi alanlar nedeniyle amaç dışı kullanımlar sonucunda sürekli olarak azalmaktadır (Kozak, 2009). Tarım ürünlerinin verimli bir şekilde üretilmesi de her geçen gün çok daha önemli bir hale gelmektedir. Verimliliği etkileyen temel faktörlerden biri, ürünlerin ortaya çıkması ve gelişmesini engelleyen çeşitli bitki, hayvan ya da mikroorganizmalardır. Bu zararlıların önlenmesi için farklı yöntemler kullanılmaktadır ve en çok kullanılanı kimyasal yöntemdir (Delen ve ark., 2005). Doğada insan, bitki ya da hayvanlara zarar veren varlıkların etkilerini önleme, yok etme, azaltma ya da bu varlıkları geri püskürtme amacıyla kullanılan kimyasal madde veya madde karışımlarına “pestisit” adı verilmektedir (EPA, 2009a).

Yabancı kaynaklı olan bu kelime; pest=zararlı, cide=öldürücü anlamına gelmek üzere kısaca zararlı öldürücü anlamına gelmektedir. Pestisitlere tarım ilacı ismi de verilir. Kimyasal mücadelede zararlı popülasyonlarını zararsız sınırdan tutmak üzere kimyasal bileşiklerin kullanıldığı bir zirai mücadele yöntemidir (Gül, 2017).

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)'nın yapmış olduğu tanıma göre pestisitler, insan veya hayvanlarda oluşabilecek hastalıkları taşıyıcı, gıdaların, tarımsal ürünlerin, ahşap ve ahşap ürünlerinin veya hayvan yemlerinin, üretimi, işlenmesi, depolanması, taşınması veya pazarlanması sırasında, bu uygulamaları olumsuz etkileyecek her türlü zararlıların önlenmesi, yok edilmesi veya kontrol altına alınmasına yönelik madde ya da madde karışımları veya hayvanlar üzerinde veya vücutlarında bulunabilecek böcekler, örümceğimsiler ve diğer zararlıların kontrol altına alınması amacıyla kullanılan maddeleri ifade eder (FAO, 2002). Bu tanımdan yola çıkarak pestisitler; bitki büyümelerini kontrol eden, yaprak kurutucu, yaprak dökücü, ham meyvelerin dökülmesini önleyici, depolanma ve taşınma sırasında ticari malların bozulmasını önlemek amacıyla hasat öncesi ve sonrası ürüne uygulanan tüm maddeleri de kapsar. Yani bu bilgiler ışığında genel olarak pestisitler günlük yaşamda kullandığımız mantar ilaçlarını, balık yemlerini, dezenfektanları ve böceksavar ilaçları kapsar. Ve ayrıca tarım ürünlerini olumsuz yönde etkileyen organizmalara karşı kullanılan kimyasal maddeleri de içerir.

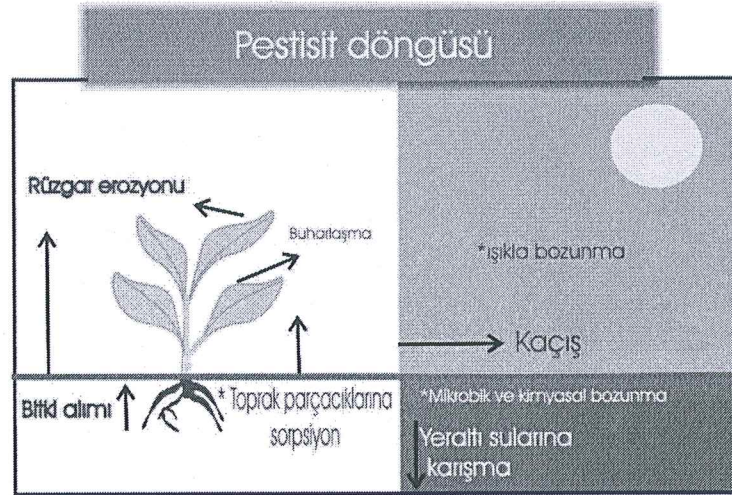
Pestisitlerin zararlı organizmalara karşı yüksek etkinliğe sahip olmaları, hızlı sonuç vermeleri, ürünü toksin salgılayan organizmalardan da koruyabilmeleri ve bilinçli ve kontrollü kullanıldıklarında ekonomik olmaları yaygın bir şekilde kullanılmalarına neden olmaktadır (Delen ve ark., 2005). Hastalık, zararlı ve yabancı otlara karşı farklı zirai mücadele yöntemleri arasında, % 95'in üzerinde bir paya sahip olan kimyasal mücadele bugün de geçerliliğini korumaktadır. Pestisitlerin kullanılmadığı durumlarda ürünlerde % 60'lara varan oranlarda kalite ve verim düşüklüğü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, ürün kaybına sebep olan zararlı organizmaları kontrol etmek amacıyla tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi, ülkemizde de bitki koruma ürünlerinin kullanılması kaçınılmazdır (Turabi ve ark., 2007). Pestisit kullanımı ülkelere göre değişim göstermektedir. Ülkemizde yılda yaklaşık 33000 ton pestisit

üretilmektedir. 2008 yılında ülkemizde hektar başına 1209 g pestisit tüketildiği, tüketilen toplam pestisit miktarının 20032 ton olduğu ve bölgelere göre de değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Tüm dünyada 3 milyon ton civarında pestisit üretilmektedir ve parasal değeri yaklaşık 30 milyon €'dur (Durmuşoğlu ve ark., 2010). Günümüzde özellikle gelişmiş ülkeler pestisitleri daha bilinçli ve kontrollü kullanmaktadır. Bunu sağlayabilmek için, AB ülkelerinde ve ABD'de birçok yasa çıkarılmış, resmi örgütler kadar, sivil toplum örgütleri de bu yönde söz sahibi duruma gelmişlerdir. 5 modern pestisit uygulamasında, çevreye zarar vermeyecek düzeyde ve gerçekten gerekli olduğunda kullanım prensibi benimsenmiştir. Bunun bir sonucu olarak, başta ABD olmak üzere, gelişmiş ülkelerde "düşük risk" ya da "doğa dostu" pestisitler tercih edilir olmuştur. Örneğin, ABD Çevre Koruma Örgütü (EPA) böyle pestisitlerin hem ruhsatlandırmasını kolaylaştırmış ve hem de kullanılmalarını teşvik etmeye başlamıştır (Tarakçı ve Türel, 2009).

Her ne kadar kimyasal mücadele, tarımsal mücadelede bir yöntem ise de, tüm mücadele yöntemleri arasında en fazla kullanılanıdır. Çünkü kimyasal mücadele yüksek etkinliğe sahiptir, hızlı sonuç verir, bilinçli ve kontrollü kullanıldığında ekonomiktir ve ürünü toksin salgılayan organizmalardan da koruyabilir (Durmuşoğlu ve ark., 2010). Pestisitlerde aranan en önemli özellik: zararlı hayvanlara ve böceklere karşı çok zehirli, memeli hayvanlara ve insana karşı çok az zehirli veya zehirsiz olmasıdır. Fakat pestisitlerin büyük çoğunluğu hem zararlı canlılar ve hem de insanlarla memeliler için aynı derecede zehirlidir. Bazı pestisitler uygulandığı bitki, toprak ve su ortamında yıllarca bozulmadan kalarak, tüm canlıların vücudunda birikebilen zehirlerdir (Yavuz, 2007).

Görüldüğü gibi pestisitler gerek dünyada, gerekse ülkemizde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar ve ekonomik açıdan büyük bir öneme sahiptirler. Ancak bununla birlikte, bir bitkiye verildiklerinde sadece o bitki yüzeyinde ya da yapısında kalmazlar, farklı yollarla doğaya yayılırlar. Pestisitler özelliklerine göre, buharlaşarak, rüzgârla taşınarak, yağmurla birlikte yer altı sularına ya da yüzey sularına karışarak sadece uygulandığı bölgeye değil, çok daha uzak mesafelere taşınabilirler (Şekil 2.6.). Pestisitlerin doğaya yayılmaları ve kalıcılıkları ışık, su,

ortamın asitliği ya da toprağın özelliklerine bağlı olarak değişebilmekte, çok hızlı bir şekilde bozunabilmekte ya da aksine kalıcılıkları daha da artabilmektedir (Karakoç ve Bakioğlu, 2010).



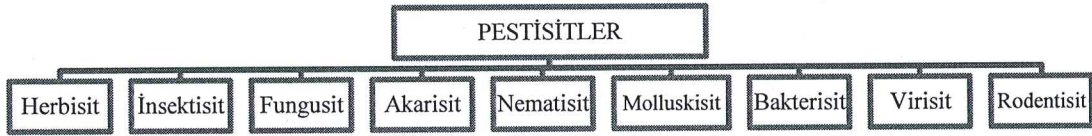
Şekil 2.6. Pestisitlerin doğadaki dönüşümleri (EXTOXNET web sayfasından uyarlanmıştır, 2009a)

Çevreye yayılan bu pestisitler, su, bitki, hayvan ya da farklı organizmalarda birikerek besin zincirinin en üstünde olan insana yüksek dozlarda geçebilir (EPA, 2009b). Çevre ve insanlar üzerindeki etkilerine baktığımızda; pestisitler, doğrudan cilt ile temas sonucu da insan vücuduna geçebilmektedir (Kozak, 2009). Alınan pestisitler, kan dolaşımı ile tüm vücuda yayılabilirler. Vücuda yayılan pestisitler olumsuz sağlık etkilerine yol açabilir. Örneğin, pestisit vücuda girmesi akciğerlere zarar verebilir. Bir kimyasal kan dolaşımı ile vücuda karıştığında birkaç farklı kademeye sahip olabilir. Çoğu durumda, vücuttan idrar veya dışkı yoluyla çıkarılırlar. Ya da yağ veya kemik gibi vücudun çeşitli bölümlerinde depolanabilir ve uzun süre bireyde kalabilir. Bir kimyasal ayrıca, bireydeki belirli organlar veya dokularla veya vücuttaki diğer bileşiklerle etkileşerek toksik etkiye neden olabilir (EXTOXNET, 2009b). Pestisitlerin kullanımı insan sağlığı ve çevreye olumsuz etkileri gibi birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Yoğun ve bilinçsiz bir şekilde kullanılmaları sonucunda gıdalarda, toprak, su ve havada pestisit kendisi ya da dönüşüm ürünleri kalabilmektedir. Tüm dünyada tarımsal sistemin ayrılmaz bir parçası olarak pestisit kullanımında tarımsal ürünlerde kalıntı riski ve çevreye olumsuz etki yapması

dikkatle üzerinde durulması gereken bir konudur. Ayrıca ruhsatlandırma sonrası pestisitlerin tarla koşullarında akıbeti ve çevreye olan etkileri de araştırılmalıdır (Tiryaki ve ark., 2010). Pestisitlerde tespit edilen tüm bu yan etkilerden dolayı pestisit kalıntılarının miktarlarının doğru yöntemlerle belirlenmesi çok önemlidir.

2.3.2. Pestisitlerin sınıflandırılması

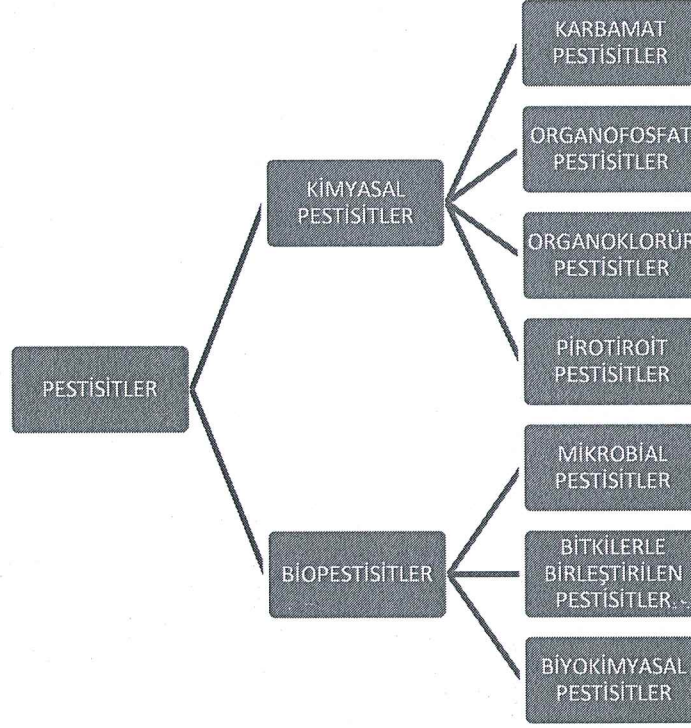
Pestisitler, görünüş, fiziksel yapı ve formülasyon şekillerine göre, etkiledikleri zararlı ve hastalık grubu ile bunların biyolojik dönemine göre, içerdikleri aktif maddenin cins ve grubuna göre, zehirlilik derecesine ve kullanım tekniğine göre çok değişik şekillerde sınıflandırılırlar. Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma şekilleri ise kullanıldıkları zararlı gruplarına ve yapısındaki aktif madde grubuna göre yapılan sınıflandırmalardır. Kullanıldıkları zararlı gruplarına ya da hedef alınan organizmaya göre yapılan sınıflandırmada en önemli üç büyük pestisit grubu, insektisit, fungusit ve herbisitlerdir (Öncüer, 1995; Toros, 1999). Şekil 2.7.'de pestisitlerin hedef alınan organizmalara göre sınıflandırılması şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. Pestisitlerin kullanım amaçlarına göre sınıflandırılması

İçerdikleri aktif maddelere göre ise pestisitler kimyasal pestisitler ve biyo-pestisitler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.8.). Kimyasal pestisitler, zararlıları engellemeye ya da öldürmek için sentezlenen kimyasal maddeleri içerirler. Kimyasal pestisitler de kendi içinde dört ayrı gruba ayrılmışlardır. Bu gruplardan biri de karbamat pestisitlerdir. Asetilkolin enzimini düzenleyen bir enzimin bozulmasına yol açarak sinir sistemini etkileyen karbamat pestisitlerin de birkaç alt grubu vardır. Bu gruplara göre fungusit ya da insektisit olarak kullanılmaktadırlar. Bu gruplardan biri

de ülkemizde ve diğer ülkelerde yaygın bir şekilde kullanılan ve bir fungusit grubu olan ditiyokarbamat pestisitleridir (Delen ve ark., 2010; Beyond Pesticides, 2010).



Şekil 2.8. İçerdikleri etkin maddelerin özelliklerine göre pestisit türleri

Delen ve arkadaşları (2010), 2006-2008 yılları arasında en fazla satılan pestisitler arasında ditiyokarbamat pestisitleri olan mankozeb, thiram ve propinebin bulunduğunu belirtmektedirler. Bu pestisitlerden mankozeb, bir etilen bisditiyokarbamat (EBDC) pestisitidir ve bu pestisitler mantar kaynaklı hastalıkların tedavisinde ve ayrıca hasat edilmiş, depolanmakta ya da taşınmakta olan ürünlerin bozulmasını önlemek amacıyla geniş spektrumlu fungusit olarak kullanılmaktadır. EBDC'ların yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedeni hastalıkların tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara nazaran daha ekonomik olmalarıdır (Ripley ve Cox, 1978). Ancak bu pestisitler, tarımda bir çok bitkiye fayda sağlamalarının yanında zehirli ya da kanserojenik etkilere sahip olabilirler. Pestisitlerin rüzgarla taşınarak, yağmurla birlikte yer altı, yerüstü sularına ve bunun gibi yollarla bir çok mesafeye ulaşması sonucunda doğaya yayılmaları kolaylaşmaktadır. Ve pestisitlerin bu şekilde yayılmaları sonucunda toprakta, suda kalıcılıkları artabilmektedir. Bu kalıcılığın sonucunda ya da pestisitlerin uygulanmasıyla teması esnasında zehirli ve

kanserojenik etkilere sahip pestisitlerden evrendeki tüm canlıların etkilenme olasılığı da artmaktadır.

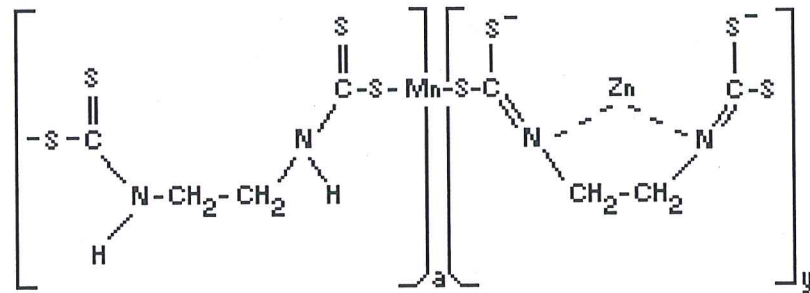
2.3.3. Mancozeb

Ditiyokarbamat pestisitleri çoğunlukla tarımda kullanılmaktadır ve son 40-50 yılda büyük ölçekte geliştirilmiş organik pestisitler grubunun bir parçasını oluşturmaktadırlar. Dünyadaki ditiyokarbamat tüketimi yılda 25000 ila 35000 ton arasındadır. Mantar öldürücüler olarak kullanılan ditiyokarbamatlar, mantarların neden olduğu geniş bir bitki hastalıklarına karşı etkilidir. İlk olarak bir ditiyokarbamat türevi olan tetrametiltilamdisülfid mantar ilacı olarak daha yaygın kullanılmaktaydı. 1934'de patent verilen madde, thiram olarak bilinir (Tisdale ve Williams, 1934). Ditiyokarbamat tipi bileşikler başlangıçta kauçuk sertleştirme işleminde hızlandırıcılar olarak kullanılmaktaydı. Endüstride su soğutma sistemlerinde, kağıt hamuru ve kağıt üretiminde kullanılmaktadırlar (McCallan, 1967). 2006-2008 yılları arasında en fazla satılan pestisitler arasında ditiyokarbamat pestisit olan mankozeb belirtilmektedir (Delen ve arkadaşları, 2010). Mankozeb, bir etilen bisditiyokarbamat (EBDC) pestisitidir, bu pestisitler mantar kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve ayrıca hasat edilmiş ürünlerin depolanmasında ya da taşınmasında bozulmaları önlemek amacıyla geniş spektrumlu fungusit olarak kullanılmaktadır (Ripley ve ark., 1978; Güven ve ark., 1998). Bu pestisitlerden EBDC'ların yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedeni aynı hastalıkların tedavisinde kullanılan diğer ilaçlara nazaran daha ekonomik olmalarıdır (Ripley ve ark.,1978).

Mancozeb [[1,2-etandilbis-[karbamoditioat]] 1967'den beri kullanılmaktadır. Mancozeb, maneb ve zineb olan iki kimyasalın kombinasyonudur (Morgan, 1982). Mancozeb, Dithane, Manzeb, Nemispot ve Manzane ticari isimleriyle pazarlanmaktadır (Hayes ve Laws, 1991).

Mancozeb bir çok meyve, fındık ve tarla ürünlerini çeşitli mantar hastalıklarından korumak için kullanılır. Primer metaboliti olan etilentiyoürenin (ETU), bir çok organizmada tiroid ve kanserojen etkiye neden olduğu tespit edilmiştir. Mancozeb, toprağa uygulanırsa, yüksek adsorpsiyon katsayısına bağlı olarak düşük bir hareketliliğe sahip olacaktır. Suyu verildiğinde ise çökeltileri ve asılı kalan katı maddeleri emmeye meyillidir. 1 ila 7 gün arasında bildirilen yarı ömrüne sahiptirler ve aynı zamanda düşük toprak kalıcılığına sahiptir. Mancozeb ile ilgili ilk endişe, su ve oksijen varlığında etilentiyoürenin (ETU) bozunmasıdır. ETU 5 ila 10 hafta kalıcılık göstermektedir (Hayes ve Laws, 1991). Mancozeb maternal toksisiteye, embriyo toksisiteye ve karakteristik teratojenik etkilere neden olmaktadır (Varnagy ve ark., 2000). Ayrıca mancozeb üreme yeteneğini olumsuz yönde etkileyebilir (Hemavathi, 1993).

Mancozeb'in metabolitleri, balık vücudunda glikojen ve yağ tükenmesine neden olur. Karaciğer detoksifikasyon organı olarak iş yapsada toksik kimyasalların etkisi altında, fonksiyonlarını yerine getiremeyebilir. Mancozeb'e maruz kalan deniz altı canlıları stres altında kalıp bu toksik maddelerin üstesinden gelmek için daha fazla enerjiye ihtiyaç duymuşlardır (Rawat ve ark., 2002).



Şekil 2.9. Mancozebin kimyasal yapısı (Srivastava ve Singh, 2013)

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Zebra balığı

Cyprinidae familyasına ait tropikal bir balık olan zebra balığının doğal yaşama alanı Hindistan, Pakistan, Bangladeş ve Güneydoğu Himalayalardır. Genellikle durgun, temiz ve bol oksijenli sularda yaşarlar. Gümüş rengi balığın gövdelerinde 7-9 adet mavi çizgiler vardır. Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir sıcaklık aralığında yaşayabilir. 18-30°C aralığında bir sorun olmadan yaşayabilirler. Zebra balıklarının üremeleri çok kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28°C'dir (Kimmel ve ark. 1995; Lele ve Krone, 1996). Zebra balığı bilimsel platformda önemli bir balık olup, genetik ve deneysel araştırmalarda omurgalı model organizma olarak sıklıkla kullanılmaktadır. İnsan genomu ile birçok homolog gene sahiptir. Bu nedenle insanlar üzerinde araştırılması mümkün olmayan deneylerde kullanılabilirler. Zebra balığı yüksek üreme potansiyeline sahip olması, yumurtaların şeffaf olması, embriyo gelişiminin dişi vücudunun dışında ve hızlı olması nedeniyle fazlasıyla kullanılmaktadırlar. Bunun yanında birçok insan hastalığı ve gelişimi genlerinin çok benzerinin zebra balığının genlerinde bulunması gibi ideal nedenlerle pek çok genetik ve deneysel araştırmada omurgalı model organizma olarak tercih edilmektedir (Kutluyer ve Aksakal, 2013). Farmakolojik ve toksikolojik araştırmalarda da en çok kullanılan organizmadır. Zebra balığı sayesinde metabolik analizler hem doku bazında hem de tüm vücutta yapılan araştırmalarda izlenebilir. Her ne kadar küçük omurgasız organizmalar metabolizma araştırmalarında kullanılsalar da, zebra balığı omurgalılarda yapılan biyolojik çalışmalar için en çok tercih edilen model organizmadır. Zebra balığı kullanılarak yapılan araştırmalar içerisinde en çok tercih edilen en önemli araştırmalar metabolomik, izotop izlenmesi,

görüntülemeye farklı bazı yaklaşımlar ve gen transferi alanlarında olmaktadır (Kayhan ve ark., 2018).

3.1.2. Ortam koşulları

Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisinde zebra balığı ile yapılacak olan deneyler için 10x20x35 cm boyutlarında akvaryumlar hazırlandı. Akvaryumların içerisinde dinlendirilmiş musluk suyu konulup sıcaklık termostatlı bir ısıtıcı ile 26-28°C olacak şekilde ayarlandı. Akvaryum içerisindeki sular hava motorları ile oksijenlendirildi. Oda içerisinde 14 saat aydınlık 10 saat karanlık olacak şekilde aydınlatma sistemi kurularak balıkların gelişim süreci için gerekli olan foto periyot oluşturuldu. Ticari akvaryumcudan 30 adet erkek zebra balığı temin edildi. Temin edilen zebra balıkları 20 litrelik akvaryumlarda bu ortam koşullarına uyum sağlamaları için 7 gün boyunca karantinaya alındı ve balıklar günde bir kez olacak şekilde ticari balık yemi ve tubifexsp. ile yemlendi. Adaptasyon süreci tamamlandıktan sonra balıklar 1 kontrol grubu 2 deney grubu olacak şekilde 3 akvaryuma 10 dişi ve 10 erkek zebra balığı koyuldu (n=10). Ve ziraatçiden temin edilen mancozeb (%80) bu çalışma için kullanılmıştır. 5 ppm (0.05 g mancozeb + 8 L su), 7.5ppm (0.075 g+mancozeb 8 L su) ve kontrol olarak 3 gruba ayrılmıştır (n:10). Dozlar solisyon haline getirildikten sonra akvaryum ortamlarına eklendi. Histolojik analiz için beşinci günün sonunda balıklar buzlu suda diseksiyon işlemine tabi tutuldular.

3.2. Yöntem

3.2.1. Testis dokularının histolojik incelenmesi

3.2.1.1.Fiksasyon (tespit etme)

Zebra balığından elde edilen testis dokularının fiksasyonu için %10'luk Nötral Formaldehit çözeltisi kullanılmıştır. Nötral Formaldehit çözeltisi için, Formaldehit çözeltisi ve distile su belirtilen miktarlarda birleştirilerek içerisinde belirtilen

miktarlarda NaH_2PO_4 ve NaHPO_4 (Tablo 3.1.) maddeleri eklenerek çözünür. Ve alınan zebra balığı testis dokusu 24 saat Tespit solüsyonunda (formaldehit çözeltisi içerisinde) bekletilmiştir.

Tablo 3.1. %10'luk nötral formaldehit hazırlanışı

| | |
|--|--------|
| %40'lık Formaldehit | 100 mL |
| Distile su | 900 mL |
| NaH_2PO_4 (Sodyummono fosfat) | 4 gr |
| Na_2HPO_4 (Disodyummonofosfat) | 6.5 gr |

3.2.1.2. Dehidrasyon

Histolojik takip işlemine alınan testis doku parçaları dehidre edilmiştir yani dokulardan suyu çıkarmak için dokular yükselen alkol seviyelerine tabi tutulmuştur. En son basamak olarak dokulardan alkolün uzaklaştırılmasını sağlayıp yerine sonraki adım olan parafine gömme işlemi için dokuların içerisinde parafin girmesini sağlamak amacıyla ksilolde bekletilmiştir.

Tablo3.2. Işık mikroskobu için dehidrasyon uygulaması

| Çözelti | Çözelti İçeriği | Miktar | Süre |
|---------|-----------------|--------|----------|
| %70 | Distile su | 30 mL | 3 dakika |
| | Etanol | 70mL | |
| %80 | Distile su | 20 mL | 3 dakika |
| | Etanol | 80mL | |
| %90 | Distile su | 10mL | 3 dakika |
| | Etanol | 90mL | |
| %100 | Distile su | | 3 dakika |
| | Etanol | 100mL | |
| %100 | Distile su | | 3 dakika |
| | Etanol | 100mL | |

3.2.1.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Testis dokuları dehidrasyon işleminden sonra 1 saat ksilolde bekletildi. Sonra Ksilol+parafin de 1 gece bekletildi. Daha sonra dokular parafine gömüldü.

3.2.1.4. Kesit alma

Parafin blok içindeki testis dokularından Leica marka manuel mikrotom yardımıyla 5-8 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler sıcak su banyosu içerisine bırakılıp albuminmayer sürülmüş lamlara alınarak oda sıcaklığında kurutulmuştur.

3.2.1.5. Boyama ve inceleme

Alınan kesitler ışık mikroskobunda incelenebilmesi için Ehrlich's Hematoxylin-Eosin (HE) (Tablo3.3.) ile boyandı. Ve son adım olarak ışık mikroskobunda incelenerek testis dokusunun histolojik değişikliklerinin fotoğrafları çekilmiştir.

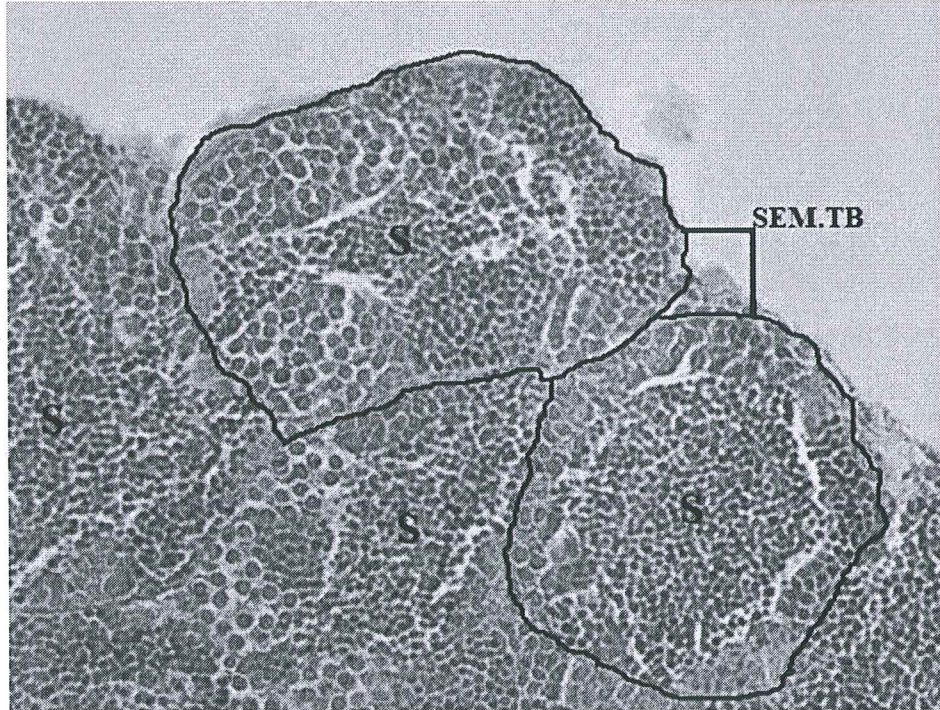
Tablo 3.3.Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

| İşlem | Uygulama Süresi |
|-----------------------|-----------------|
| 1) Ksilol | 2x3 dk |
| 2) %100 Etanol | 2x1,5 dk |
| %90 Etanol | 30 sn |
| %70 Etanol | 30sn |
| 3)Akarsu altında | 30 sn |
| 4)Harris Hematoksilen | 1 dk |
| 5)Distile su | 4 dk |
| 6)%95 Etanol | 30 sn |
| 7)Eozin | 1 dk |
| 8)%100 Etanol | 2x1,5 dk |
| 9)Ksilol | 45 sn |
| 10)Entellanla kapama | |

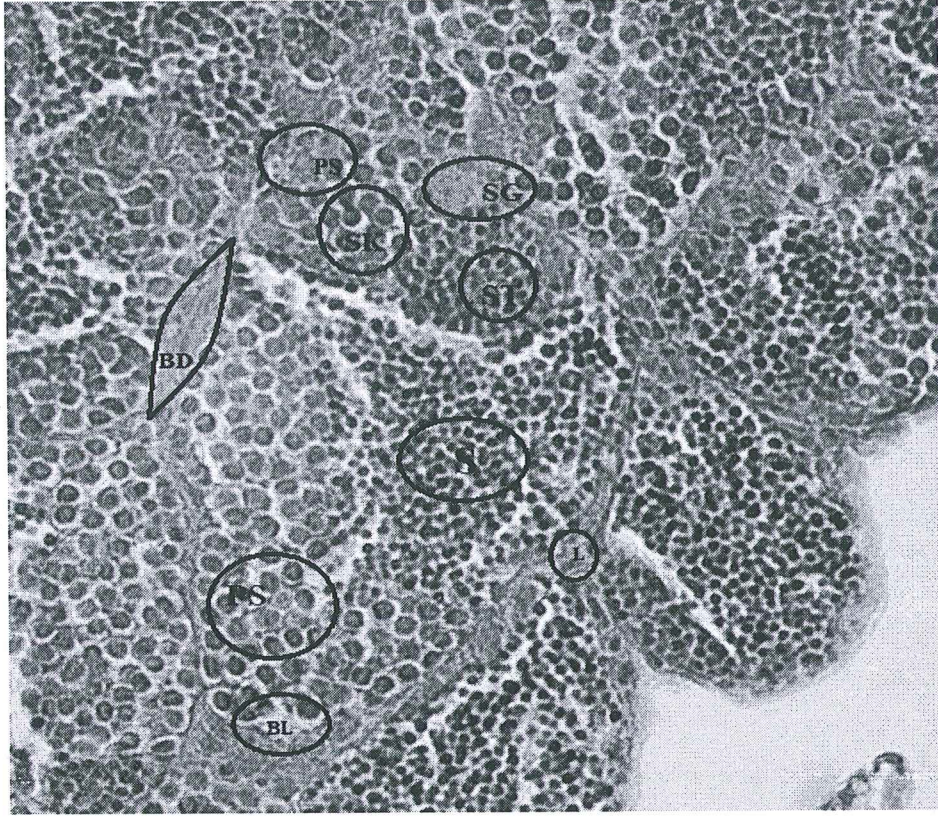
BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kontrol Grubu

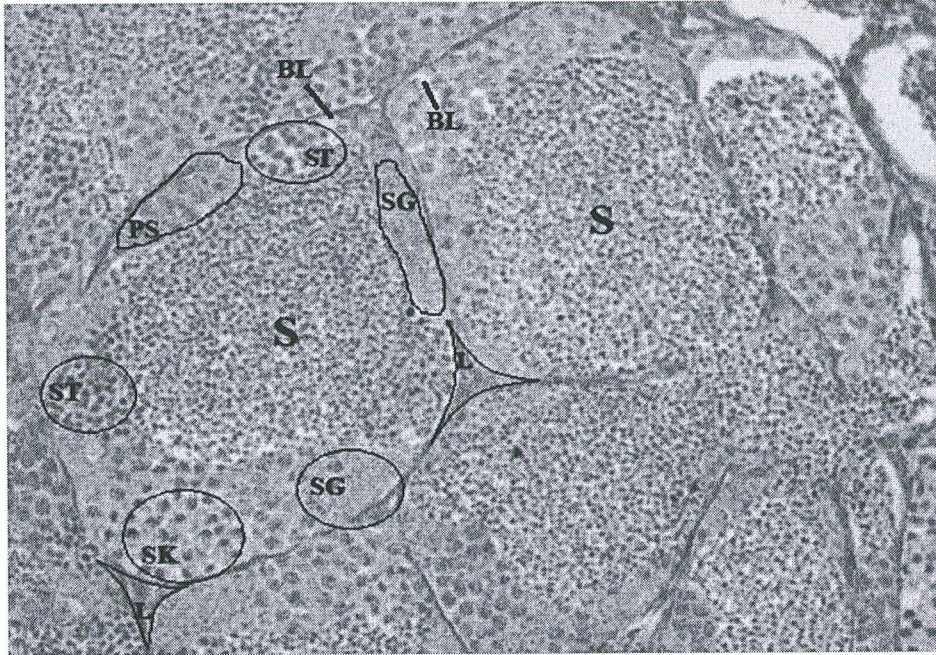
Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde kontrol grubu zebra balıklarından alınan testislerin periton duvarları ile çevrili olduğu görülmüştür. Zebra balığı testisinin histolojik yapısında çok sayıda seminifer tübüllere rastlanmaktadır (Şekil 4.1.). Spermatojenik seriye ait hücre kümeleri görülmüştür. Seminifer tübüllerde spermatogonyum hücreleri, primer spermatositler, sekonder spoermatositler, spermatidler ve sperm hücreleri ile birlikte seminifer tübüller arasında Leyding hücreleri bulunmaktadır (Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).



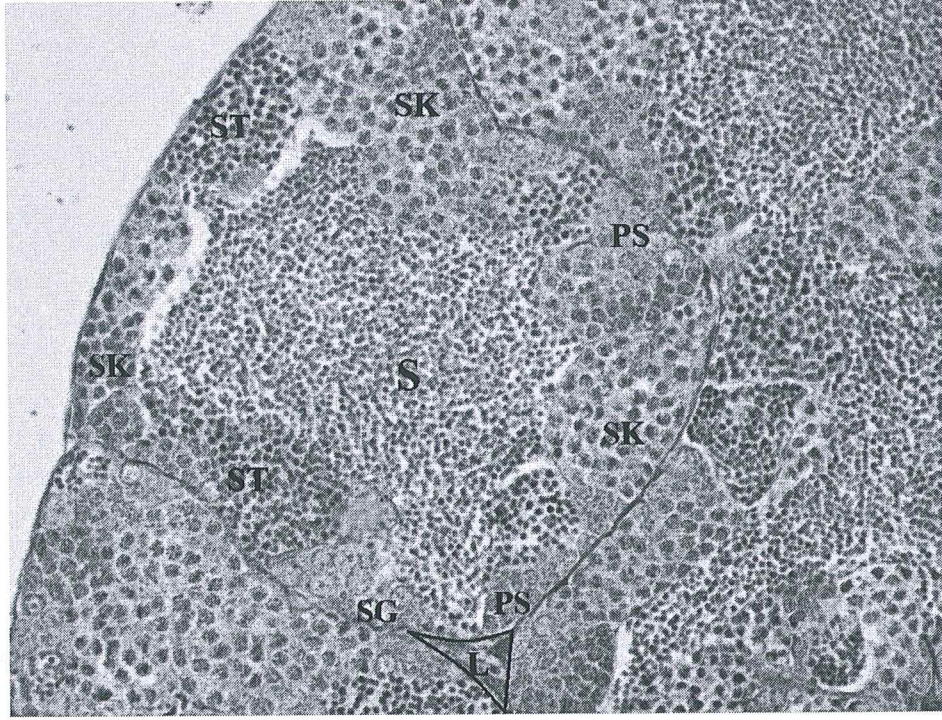
Şekil 4.1. Kontrol Grubu: Seminifer tübüller (SEM. TB.), içerisindeki sperm hücreleri (S), H&E Boyama, x40



Şekil 4.2. Kontrol Grubu: Spermatogonyum hücreleri (SG), primer spermatozitler (PS), sekonder spermatozitler (SK), spermatoitler (ST), sperm hücreleri (S), bağ doku (BD), bazal lamina (BL), Leyding hücreleri (L), H&E Boyama, x40



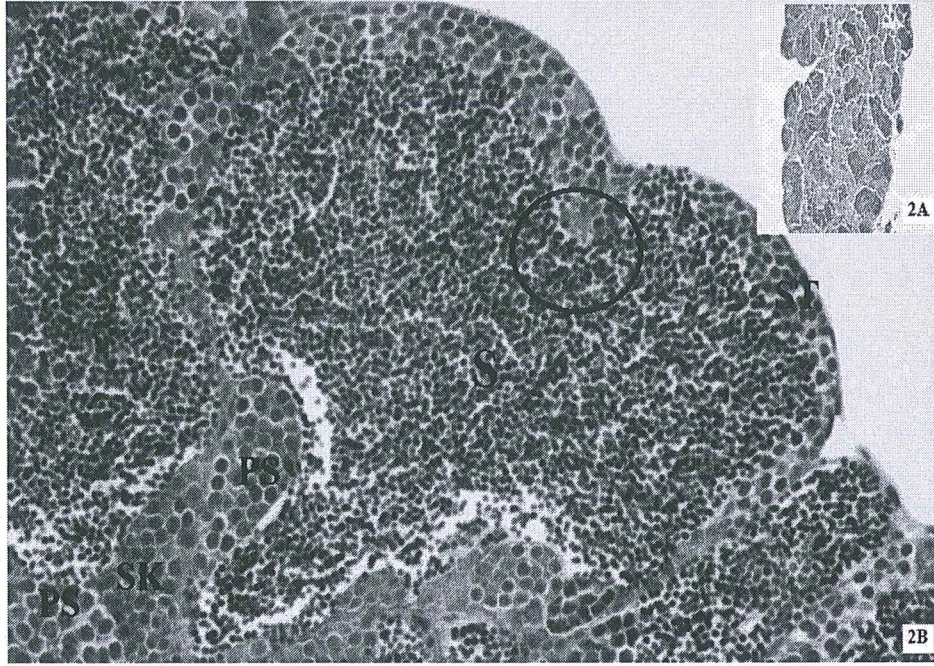
Şekil 4.3. Kontrol Grubu: Seminifer tübüller içerisindeki spermatogonyum hücre kümeleri; spermatogonyum hücreleri (SG), primer spermatozitler (PS), sekonder spermatozitler (SK), spermatoitler (ST), sperm hücreleri (S), Leyding hücreleri (L), bazal lamina (BL), H&E Boyama, x40



Şekil 4.4. Kontrol Grubu: Seminifer tübüller içerisindeki spermatogenik hücre kümeleri, Spermatogonyum hücreleri (SG), primer spermatositler (PS), sekonder spermatositler (SK), spermatidler (ST), sperm hücreleri (S), Leyding hücreleri (L), H&E Boyama, x40

4.2. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanan Grup

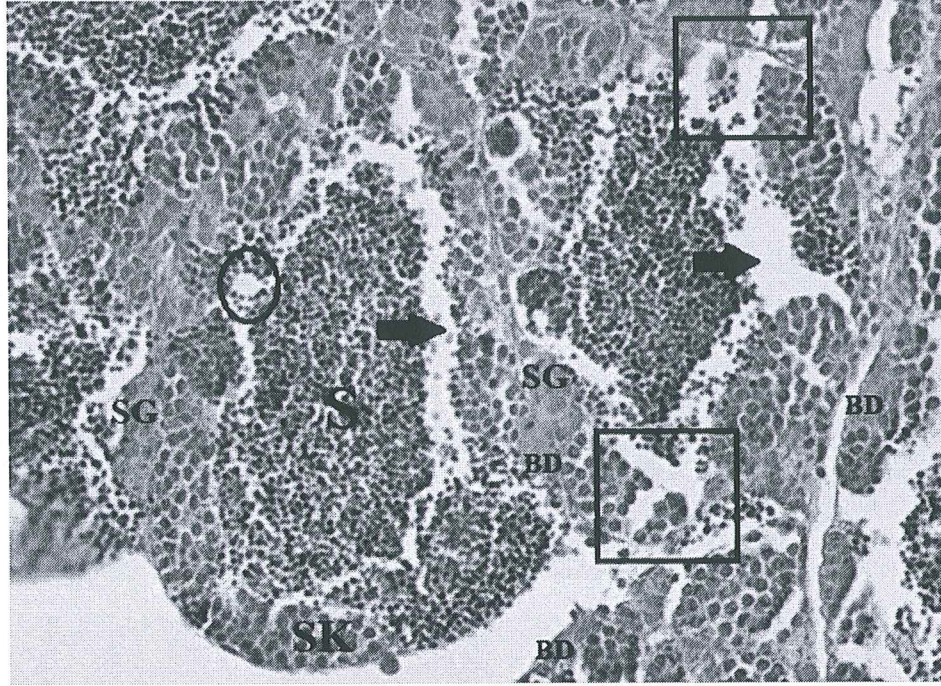
Kontrol grubu ve 5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış olan deney grupları karşılaştırıldığında; genel olarak seminifer tübül şekillerinde bozulmalar tespit edilmiştir (Şekil 4.5-2A). Seminifer tübüllerde ikili birleşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.5-2B) ve sperm sayılarında artış ile (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), seminifer tübüllerde açıklıklar (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) tespit edilmiştir. Sperm hücrelerinde ve spermatogenik hücre kümeleri arasında vakualizasyonlar gözlenmiştir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Bağ dokusunda artış gözlenmiştir (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.). Gelişen spermatogenetik hücre serisinde yer alan hücre kümelerinde azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.5.).



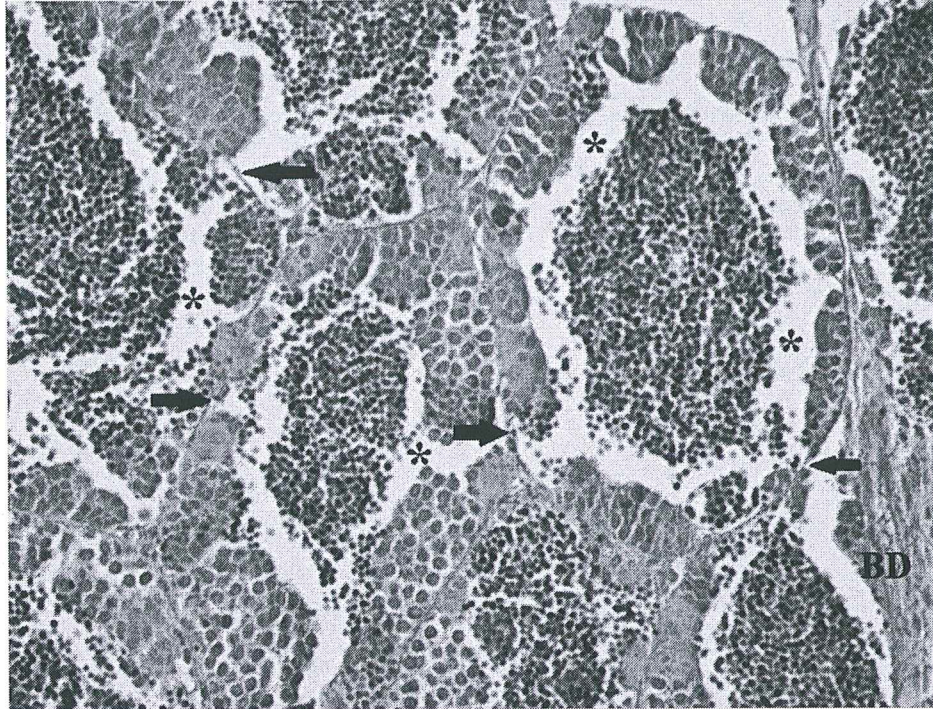
Şekil 4.5. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığının genel testis görüntüsü (2A), H&E boyama, x10, Zebra balığının seminifer tübüllerindeki ikili birleşmeler (daire içerisinde gösterilmiştir), primer spermatositler (PS), sekonder spermatositler (SK), spermatit hücrelerinde azalma (ST), sperm sayılarında artış (S), H&E boyama, x40



Şekil 4.6. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığının spermelerinde ve spermatogjenik hücre gruplarında meydana gelen vakualizasyon (V), primer spermatositler (PS), spermatit sayısında azalma (ST), sperm hücrelerinde artış (S), H&E boyama, x100



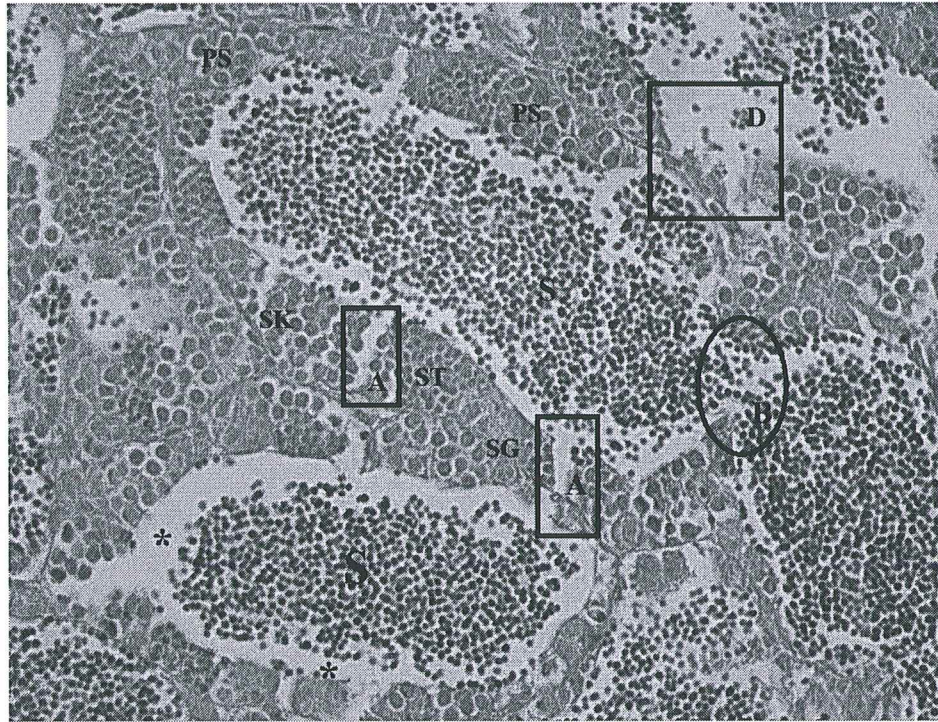
Şekil 4.7. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığının spermalarında meydana gelen vakualizasyon (Daire içerisinde gösterilmiştir), seminifer tübüllerde açıklık (ok işareti ile gösterilmiştir), seminifer tübüllerdeki dejenerasyonlar (kare içerisinde gösterilmiştir), bağ dokusunda artış (BD), sperm hücreleri (S), sekonder spermatositler (SK), spermatogonyum hücreleri (SG), H&E boyama, x40



Şekil 4.8. 5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen seminifer tübüllerdeki açıklık (*), bazal lamina incilmesi (ok simgesi ile gösterilmiştir.), bağ dokusunda artış (BD), H&E boyama, x40

4.3. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanan Grup

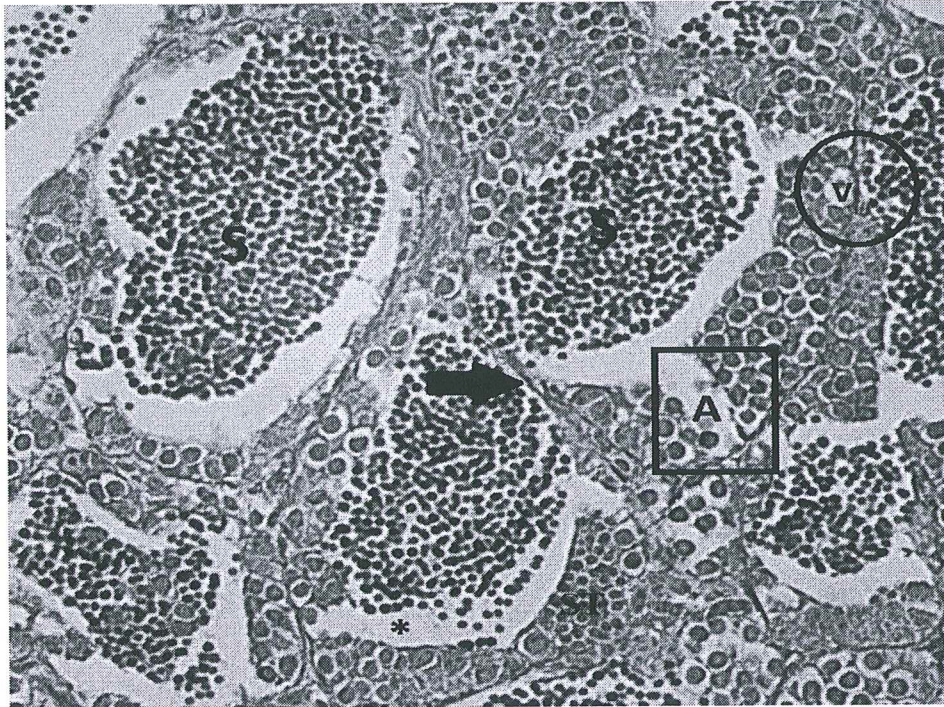
Seminifer tübüllerde dejenerasyonlar (bozulmalar) ve açıklıklar görülmüştür (Şekil 4.9., Şekil 4.11., Şekil 4.13.). Seminifer tübüllerde şekil bozuklukları gözlenmiştir. Seminifer tübüllerde ikili (Şekil 4.9., Şekil 4.13.) ve üçlü birleşmeler tespit edilmiştir (Şekil 4.14.). Spermatojenik hücre gruplarında ayrılmalar gözlenmiştir (Şekil 4.11., Şekil 4.14.). Spermelerde vakualizasyonların (Şekil 4.13.) dışında spermatojenik hücre gruplarında vakualizasyon (Şekil 4.11., Şekil 4.14.) ve Leyding hücrelerinde vakualizasyon (Şekil 4.12.) tespit edilmiştir. Spermatojenik hücre gruplarında azalış, sperm hücrelerinde artışlar (Şekil 4.9., Şekil 4.10.) görülmüştür. Bazal laminanın incelmeye başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11.). Bağ dokusunun kaybolmaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.). Bazı seminifer tübüllerinin içerisinde spermatojenik hücre gruplarının yok olduğu ve sadece spermiler ile dolu olduğu görülmüştür (Şekil 4.10.).



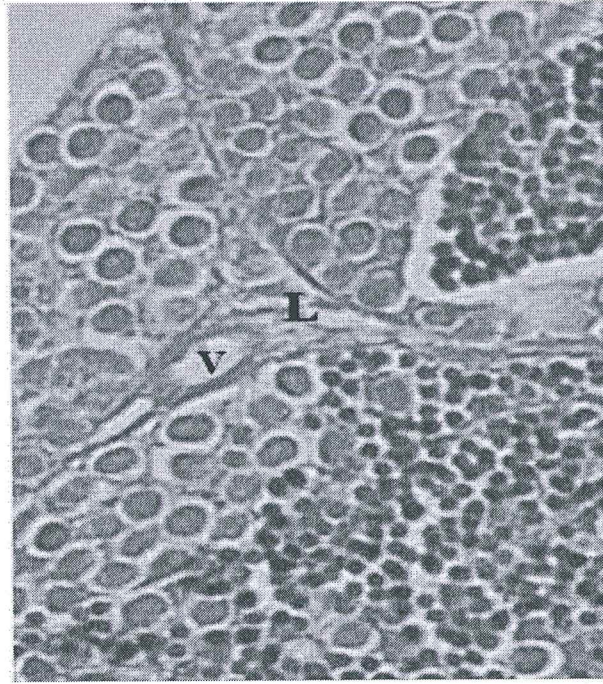
Şekil 4.9. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen spermatojenik hücre gruplarındaki ayrılmalar (A), seminifer tübüllerdeki ikili birleşme (B), seminifer tübüllerdeki açıklık (*), sperm hücrelerindeki artış (S), spermatogonyum hücresinde azalış (SG), seminifer tübüllerde dejenerasyon (D), primer spermatosit (PS), sekonder spermatosit (SK), H&E boyama, x40



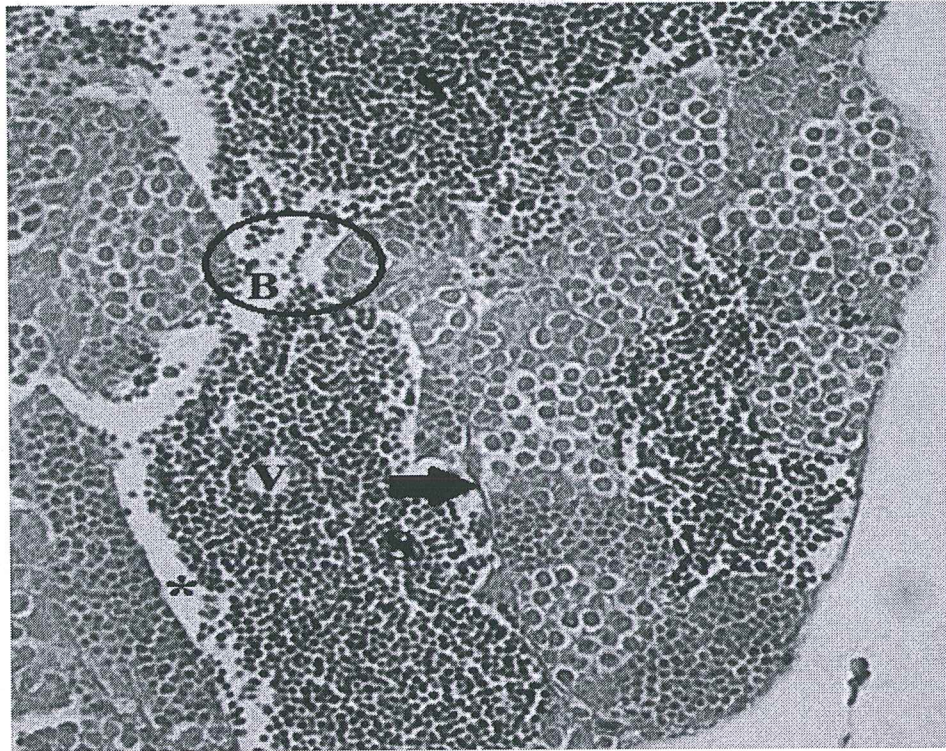
Şekil 4.10. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının azalması, tübüller içerisinde sadece sperm hücrelerinin gözlenmesi, sperm hücrelerindeki artış (S), H&E boyama, x40



Şekil 4.11. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının ayrılması (A), bazal laminanın incelmeye başlaması (ok işareti ile gösterilmiştir), spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyon (V), seminifer tübüllerde açıklık (*), sperm hücresi (S), spermatit (ST), H&E boyama, x40



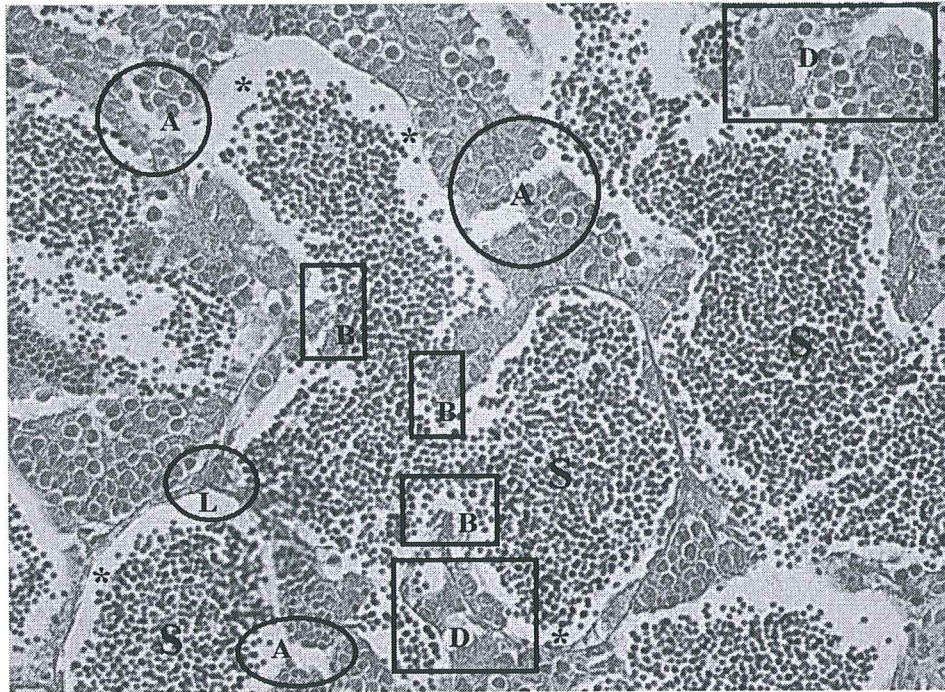
Şekil 4.12. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığı testis dokusunda meydana gelen Leyding hücreindeki vakualizasyon (V), H&E boyama, x100



Şekil 4.13. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen spermlerdeki vakualizasyon (V), bağ dokusunun kaybolmaya başlaması (ok işareti ile gösterilmiştir), seminifer tübüllerde ikili birleşme (B), seminifer tübüllerde açıklık (*), sperm hücresi (S), H&E boyama, x40



Şekil 4.14 7,5 ppm mancozeb maddesi uygulanmış Zebra balığında meydana gelen spermatogenik hücre gruplarındaki ayrılmalar (A), Spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyon (V), Seminifer tübüllerdeki üçlü birleşme (B), Bağ Dokusunun kaybolmaya başlaması (ok işareti ile gösterilmiştir), sperm hücrelerindeki artış (S), spermatogonyum hücrelerinde azalış (SG), H&E boyama, x40



Şekil 4.15. 7,5 ppm Mancozeb Maddesi Uygulanmış Grup: Zebra balığında meydana gelen spermatogenik hücre gruplarındaki ayrılmalar (A), Seminifer tübüllerdeki üçlü birleşme (B), seminifer tübüllerdeki açıklık (*), sperm hücrelerindeki artış (S), seminifer tübüllerde dejenerasyon (D), Sperm (S), H&E boyama, x40

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pestisitler yaşam alanlarında zarar verici canlıların arınması amacı ile kullanılan organik bileşiklerdir. Ancak bunların abartılı bir şekilde ve bilinçsizce kullanılmaları çevre kirlenmesine neden olmaktadır. Kirleticiler farklı yollarla doğaya karışır ve çevreye etkisiyle diğer canlılar etkilenir. Bu canlıların başında da sucul canlılar yer almaktadır. Mancozeb maddesi her ne kadar tarımda mantar kaynaklı hastalıkların tedavisinde kullanılsa da su ve oksijen varlığında uzun süre kalıcılık göstermektedir. Bu çalışma mancozeb maddesinin zebra balıkları testis dokularında olumsuz etkileri olup olmadığını araştırmak için yapılmıştır. Çünkü bu konuda çok fazla bir bilgi bulunmamaktadır.

Mancozeb maddesinin zebra balığının testis dokuları üzerindeki histolojik etkileri araştırılıp kontrol grupları ile deney grupları karşılaştırıldığında; seminifer tübüllerde dejenerasyonlar, seminifer tübül şeklinde bozulmalar tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre sperm sayılarında artış olmuştur. Sperm hücrelerinde ve spermatogenik hücre gruplarında vakualizasyonlar görülmüştür. Bağ dokusunda artışlar olduğu gözlenmiştir. Spermatogenik hücre gruplarında yapısal bütünlüğün bozulduğu, spermatogenik hücre gruplarının birbirlerinden ayrıldığı görülmüştür. Seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının azaldığı ve bazı tübüllerin içerisinde spermatogenik hücrelerin yok olduğu, tübüllerin içlerinin sperm ile dolu olduğu tespit edilmiştir. Yani bu çalışma gösteriyor ki maddenin dozu arttıkça dokularda oluşan toksisite etkisi artmaktadır.

Nonilfenol maddesi uygulanan Plati balığı (*Xiphophorus maculatus*)'nın testis yapısını büyük ölçüde değiştirmiştir. Kontrol grubu balıkların testislerinde farklı spermatogenetik aşamada düzenli hücre grupları tespit edilmiştir. Sertoli hücreleri, gelişmekte olan sperm hücre demetlerini çevrelemiş olarak gözlenmiştir. Olgunlaşmış sperm demetleri tübüller içerisinde görülmüştür. Deney grubunda

nekrotik spermatozeugmataların (iki veya daha fazla spermin birleşmesi) periferinde sertoli hücrelerinin sayısında ve hacminde artış tespit edilmiştir. Bu artış spermatozoon deformasyonu olarak ifade edilmiştir (Kinnberg ve ark., 2000). Yapılan bu çalışma ışık mikroskobu ile yapılmış olup sertoli hücreleri tespit edilememiştir ve bizim çalışmamızla benzerlik göstermemektedir.

Diazinon maddesi ile bluegill (ay balığı) balıklarında (*Lepomis macrochirus*) yapılan başka bir çalışmada germinal epitelde organizasyon bozukluğu, seminifer tübül kontürlerinde düzensizleşme, germinal epitel hücre sayısında azalma gibi yapısal değişiklikler belirlenmiştir (Dutta ve ark., 2003). Diazinon maddesi ile yapılan çalışma ile bu çalışmadaki sonuçlar kısmen benzerlik göstermektedir.

Deltametrin'in kılıç kuyruğu (*Xiphophorus helleri*) balıklarının testis dokusu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada; artan dozlara bağlı olarak, olgun spermlerin sayılarının önemli ölçüde azaldığı ve seminifer tübüllerde yapısal bozulma meydana geldiği gözlenmiştir. Spermatogonyum hücre kümelerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Seminifer tübüllerin içerisindeki hücre katmanlarının azaldığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, pestisit kontaminasyonunun sperm kalitesini önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir (Yön ve ark., 2012). Bir pestisit türü olan deltametrin ile yapılan çalışmadaki sonuçlar bu çalışmadaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

4-tert-pentifenol'e maruz kalan *Cyprinus carpio*'nun erişkin erkeklerinde seminifer tübül içerisindeki hücre gruplarında azalmalar ile germinal epitelde atrofi oluşumları tespit edilmiştir. Juvenil erkek bireylerde ise testiste oosit ve ovidukt oluşumu gözlenmiştir (Gimeno ve ark., 1998). 4-tert-pentifenol'e maruz kalan *Cyprinus carpio* ile yapılan çalışmada seminifer tübüllerdeki hücre gruplarının azalması bizim çalışmamızdaki tübüllerdeki spermatogenik hücre gruplarının azalması yönünden uyumlu olan bulgulardandır.

Bisfenol-a (BPA) farklı dozlarda 4 mg/L ve 8 mg/L olarak *Lepistes* balığın (*Poecilia reticulata*) testis dokusu üzerindeki akut etkileri araştırılmış olup sonuçlarına

bakıldığında; 4 mg/L BPA'ya maruz kalan lepistes balıklarında seminifer tübüller arasında açıklıklar, seminifer tübüllerin morfolojisinde bozukluklar ve bağ dokusunda artışlar gözlenmiştir. 8 mg/L BPA maruz kalan grupta sperm hücrelerinde ve seminifer tübüllerde azalma tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerde distorsiyon (açıklık), tübül yapılarında atrezi izlenmiştir. Spermatogonium sayısında azalma görülmüştür. Seminifer tübüller ve bağ doku arasında açılma olduğu tespit edilmiştir (Yön ve Akbulut, 2013). BPA ile yapılan çalışma ile bu çalışmadaki sonuçlar kısmen benzerlik göstermektedir.

Oryzias latipes'e (Japon balığı) Bisfenol A uygulanmış ve juvenil erkek bireylerde testiste sperm sayısında azalmalar, fibrozis ve tübüller içerisinde oositler olduğu bildirilmiştir (Yokota ve ark., 2002). Yapılan bu çalışmadaki mancozeb maddesi sperm sayılarında artışa neden olması Bisfenol A maddesi ile yapılan çalışmadaki sonuçlarla benzerlik göstermemektedir.

Yükselen dozlarda Cd maddesine maruz kalan kılıç kuyruk balığı (*Xiphophorus helleri*) testisinde yapısal bozuklukların meydana gelmediği gözlenmiştir. Cd'ye maruz kalan kılıçkuyruk balığında seminifer tübüllerde dejeneratif hücreler izlenmiştir. Seminifer tübüllerin düzensiz şekil aldığı tespit edilmiştir. Spermatitlerin arttığı ve kümelenme gösterdiği görülmüştür. Seminifer tübüllerde açıklıklar tespit edilmiştir. Spermatogonyum hücrelerinde azalmalar ve spermatogenik hücre gruplarında açıklıklar olduğu görülmüştür (Yön ve ark., 2015). Yapılan bu çalışma seminifer tübüllerin düzensizliği, seminifer tübüllerdeki ve spermatogenik hücre gruplarındaki açıklıklar ile spermatogonyumlarda hücre kümelerinin azalması yönünden bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Xu ve ark., (2008) yaptığı çalışmada 17 a-Etinilestradiol'un erkek ve dişi Zebra balıklarında (*Danio rerio*) üreme fonksiyonlarını bozduğunu tespit etmişlerdir. Deneysel grubunun testis dokusunda kontrol grubuna kıyasla 2 ng / l EE2 (11 erkek balıktan 7'si) ve 10 ng / l EE2'de (8 erkek balıktan 6'sı) önemli anormal testiküler bozukluklar izlenmiştir. Bu anormalliklerin, sperm kanalının malformasyonlarını (oluşum bozuklukları), germ hücre tiplerinde değişiklikleri ve sperm sayılarının

azalmasını içerdiği bildirilmiştir. Yaptığımız çalışma yapılan bu çalışma ile kısmen benzerlik göstermektedir.

Yön ve Akbulut (2016) tarafından yapılan çalışmada titanyum dioksitin zebra balığı (*Danio rerio*) testislerinde düşük dozda (1 mg/L TiO_2), spermatogonyum ve spermatozoid hücrelerinin sayısında azalma izlenirken yüksek dozda (2 mg/L TiO_2), seminifer tübüllerde parçalanma gözlenmiştir. Spermatogenik seriye ait hücre gruplarında ayrılma tespit edilmiştir. Yüksek dozda seminifer tübüllerde görülen bozulmalar, 1mg/L TiO_2 'ye maruz kalan grupla karşılaştırıldığında artan düzeyde olduğu açıklanmıştır. 4 mg/L maruz kalan gruptaki dokularda spermatogonyum, spermatozoid ve spermatid hücrelerinin tübüllerde sayıca azaldığı tespit edilmiştir. Spermatogenik hücrelerin yerini sperm hücrelerinin aldığı izlenmiştir. Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusunun tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Çalışmada çıkan sonuçlar çalışmamızdaki sonuçlar ile benzerdir. Aynı olumsuz etkilere mancozeb maddesinin de neden olduğu düşünülmüştür.

Raizada ve ark., (1997) yaptığı çalışmada Mancozeb'e maruz kalan sıçanların testis ve epididimlerinde değişiklikler gözlenmiştir. Gözlenen değişikliklerin, seminifer tübüllerde patolojik değişimler, germinal hücrelerin eğilmesi, dev hücrelerin oluşumu ve enkaz maddelerinin lümen içinde birikmesi ile birlikte nekrotik seminifer tübülleri olduğu bildirilmiştir. Yüksek dozda mancozebe maruz kalan sıçanların seminifer tübüllerinde sperm kaybıyla birlikte hasar görmüş epitel hücreleri tespit edilmiştir.

Albino farelerde Mancozeb'in testislerde ve üreme organları üzerinde biyokimyasal etkileri çalışılmıştır. Bu çalışmaya göre; spermatogonyum, spermatid ve spermlerin çapları azaldığı belirtilmiştir. Spermatid sayıları 10 gün Mancozeb'e maruz kalan farelere göre 20 gün Mancozeb'e maruz kalan farelerde önemli ölçüde azaldığı açıklanmıştır. Testisin histolojik incelemesinde Mancozeb'e maruz kalmış farelerde maruz kalma süresinin artmasıyla birlikte spermatogonyum, spermatozoid ve spermatid hücrelerinde belirgin düşüş gözlenmiştir. Aynı zamanda, seminifer tübül lümeninde daha az sayıda spermler tespit edilmiştir (Kaliwal ve ark., 2003).

Mancozeb'in testis üzerindeki toksik etkileri sıçanlarda da değerlendirilmiş; spermatogenik hücrelerinde ve seminifer tübüllerde dejenerasyon tespit edilmiştir (Joshi ve ark., 2005).

Sonuç olarak; farklı alanlarda kullanılan pestisitlerin, canlıların üremeleri üzerindeki olumsuz etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Düşük dozlarda bile kimyasal kullanımı ekosistemdeki pek çok canlıya zarar vermektedir. Canlılar üzerindeki bu olumsuz etkileri göz önüne alarak pestisit kullanımı mümkün olduğunca azaltılmalıdır. Ditiyokarbamat pestisit türü olan Mancozeb'in, yaptığımız çalışmada seminifer tübüllerde dejenerasyonlara, spermatogenik hücrelerde yapısal değişikliklere, tübül şeklinde bozulmalara neden olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen tüm bu histolojik değişiklikler gonad farklılaşması ve üreme ile yakından ilgilidir. Ve bu çalışmada gösteriyor ki Mancozeb zebra balığı (*Danio rerio*) erkek gonadlarında olumsuz etkilere neden olmuştur. Buna bağlı olarak erkek bireyler üreme potansiyelinde bozulmalar ortaya çıkacaktır. Yapılan bu çalışmanın benzer konularda yapılacak olan diğer çalışmalara yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbulut, C. 2012. Bisfenol A'nın zebra balığı (*Danio rerio*) primordiyal germ hücreleri üzerine olan etkilerinin histolojik ve moleküler yöntemlerle incelenmesi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi.
- Akbulut, C., Yön, N.D. 2016. Histopathology and cellular apoptosis at spermatogenic cells of zebrafish (*Danio rerio*) at acute and sub-chronic exposure of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles. Fresenius Environmental Bulletin, 2991-2997.
- Beyond Pesticides. 2010. California's Pesticide Use Declined, Yet Millions of Pounds of Toxic Pesticides Continue.
- Brand, M., Granato, M, Nusslein-Volhard, C. 2002. "Keeping and raising zebrafish". In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein-Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: Oxford University Press, p: 7-37.
- Brenner, S., Elgar, G., Sandford, R., Macrae, A., Venkatesh, B., Aparicio, S. 1993. Characterization of the pufferfish (fugu) genome as a compact model vertebrate genome. Nature, 366: 265-268.
- Carpio, Y., Estrada, M.P. 2006. Zebrafish as a Genetic Model organism. Biotechnol. Apl.,23: 4.
- Crnogorac-Jurcevic, T., Brown, J.R., Lehrach, H., Schalkwyk, L.C. 1997. Tetraodon fluviatilis, a new puffer fish model for genome studies. Genomics, 41: 177-184.
- Dahm, R. 2002. Atlas of embryonic stages of development in the zebrafish'. In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein-Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: Oxford University Press, 219-236.
- Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005 Türkiye'de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara.
- Delen, N., Kınay, P., Yıldız, F., Yıldız, M., Altınok, H. H., Uçkun, Z. 2010. Türkiye tarımında kimyasal savaşımın durumu ve entegre savaşım olanakları, Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongre, Ankara.
- Durmuşoğlu, E ., Tiryaki, O.,Canhilal, R. 2010. Türkiye'de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Dayanıklılık Sorunları. VII. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ankara, Bildiriler Kitabı 2:589-607, 11-15.
- Dutta, H.M. Meijer H.J. 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. Environ Pollut, 12: 355-360.

- EPA,. <http://www.epa.gov/pesticides/>. 2009a. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri, Erişim Tarihi: 14.03.2019.
- EPA (Environmental Protection Agency). 2009b. Types of Pesticides. Washington D.C., USA. (Online) <http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>, Erişim Tarihi: 20.03.2019.
- Erdoğan O., Aksakal E. 2008. Moleküler Biyoloji Veritabanları ve Kullanımları. Su Ürünlerinde Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 237:37-50.
- Ertuğ, N.D., Akbulut, C., Helli, S. ve Olgun, U. 2015. Histological changes in the liver of the zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to poly (2-ethyl-2-oxazoline). Elixir Biosciences, 1-3:27-33.
- Exttoxnet. 2009a. Movement of pesticides in the environment, <http://exttoxnet.orst.edu/tibs/movement.htm>. Erişim tarihi: 01.03.2019
- Exttoxnet. 2009b. Entry and fate of chemicals in Humans, <http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/exttoxnet/TIB/entry.html>. Erişim tarihi: 01.03.2019
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2002. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Retrieved on 2007-10-25.
- Gilmour, D.T., Jessen, J.R., Lin, S. 2002. Manipulating gene expression in the zebrafish. In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein-Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: Oxford University Press, p: 121-43.
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, C. and Bowmer, T. 1998. Demasculinisation of Sexually Mature Common Carp, *Cyprinus carpio* Exposed to 4-tert-pentylphenol During Spermatogenesis, *Aquatic Toxicol.*, 43:(2-3), 193-109.
- Güven, K., Deveci, E., Akba, O., Onen, A., Pomerai, D. 1998. The accumulation and histological effects of organometallic fungicides Propineb and Maneb in the kidneys of fetus and female rats during pregnancy. *Toxicology Letters*, 99:91-98.
- Gül, H. 2017. Türkiye'de kullanılan zirai ilaçların sağlığa etkileri. Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sağlık Yönetimi Anabilim Dalı, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi.
- Hemavathi, E., Rahiman, M. 1993. Toxicological effects of ziram, thiram and dithane M-45 assessed by sperm shape abnormalities in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38:393-398.
- Hayes, W.J. Laws, ER. 1991. Handbook of pesticide toxicology vol. 3. Classes of pesticides. New York Academic Press Inc., 1:1451.
- Hedges, S.B. 2002. The Origin and Evolution of Model Organisms. *Nature Rev.*, 3: 838-849.

- Himmelbauer, H., Dunkel, I., Otto, G.W., Burgtorf, C., Schalkwyk, L.C., Lehrach, H. 1998. Complex probes for high-throughput parallel genetic mapping of genomic mouse BAC clones. *Mamm. Genome*, 9: 611–619.
- Joshi, S.C., Gulati, N. ve Gajraj, A. 2005. Evaluation of Toxic Impacts of Mancozeb on Testis in Rats , *Asian J. Exp. Sci.*, Vol. 19, No. 1, 73-83.
- Karakoç, Ö., Nakiboğlu, N. 2010. Ditiyokarbamat Pestisitleri ve Tayin Yöntemleri, *BAÜ FBE Dergisi*, 12-1, 112-135.
- Kayhan, E., Kaymak, G., Esmerduruel, H.E., Tartarkızılkaya, Ş. 2018. Biyolojik araştırmalarda Zebra balığının (*Danio rerio* Hamilton,1822) kullanılması ve önemi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2): 38-45.
- Kierszenbaum, A.L. 2006. *Histology and Cell Biology*. Mosby. Çeviri: Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, Sf: 458-464.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. 1995. Stages Of Embryonic-Development Of The Zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2000. Concentrationdependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Mar Environ Res*, 50: 169-173.
- Koc, N.D., Teksöz, N., Ural, M., Akbulut, C. 2012. Histological structure of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) testicles. *Elixir Aquaculture* 46:8117-8120.
- Koç-Yön N.D., Akbulut, C., Kayhan, F.E., Kaymak G. 2012. Histopathological Changes in Testis of the Swordtail fish *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) Exposed to Deltamethrin. *Fresen Environ Bull*, 21(10): 2866-287.
- Kozak, B. 2009. Pestisit kullanımı ve sorunları, www.tarim.gen.tr.
- Kutluyer F., Aksakal E. 2013. Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımı. *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*, 28(2):101-107.
- Lele, Z.,Krone, P.H., 1996. The Zebrafish as A Model System In Developmental Toxicological And Transgenic Research. *Biotechnology Advances*, Vol. 14, No. 1, pp. 57-72.
- Lone S., Shah R., Lone A. 2014. Mancozeb-Impact on Biochemical Profile of Adult Mice (*Mus musculus*), *American Research Journal*, 1:1.
- Ma, C., Parng, C.L., Seng, W.L., Zhang, C., Willett, C., McGrath, P. 2003. Zebrafish: an in vivo model for drug screening. *Innov. Pharmaceut Tech.*,38-45.
- Maier, D., Marte, B.M., Schaefer, W., Yu, Y., Preiss, A. 1993. Drosophila evolution challenges postulated redundancy in the E(spl) gene complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90: 5464–5468.
- McCallan, S. E. A. 1967. History of fungicides. Pages 1-37 in: *Fungicides, An Advanced Treatise*, Vol. 1. Academic Press, New York.

- Morgan, D. P. 1982. Recognition and management of pesticide poisonings. Third edition. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. U.S. Government Printing Office.
- Müller H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*. 66:84-87.
- Ni, Y., Qiu, P., Kokot, S. 2004. Simultaneous determination of three organophosphorus pesticides by differential pulse stripping voltammetry and chemometrics, *Analytica Chimica Acta*, 516, 7-17.
- Öncüer C. 1995. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Ege Üniv. Basımevi, İzmir, 333.
- Pelegri F. 2002. "Mutagenesis". In: Zebrafish: A Practical Approach, Nusslein-Volhard C, Dahm R, (eds.). Oxford: Oxford University Press, p: 145-74.
- Raizada, R.B., Srivastava, M. K. ve Kackar, R. 1997. Induction of Gonadal Toxicity to Chronic Exposure to Mancozeb. *Industrial Health*, 35,104-111.
- Rawat D.K., Bais V.S., Agrawal N.C. 2002. A correlative study on liver glycogen and endosulfan toxicity in *Heterpneustes fossilis*. *J Environ Biol.*,23: 205207.
- Ripley, B. D., Cox, D. F. 1978. Residues of ethylene bis (dithiocarbamate) and ethylenethiourea in treated tomatoes and commercial tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26:1137-1143.
- Roberts, R. J., Ellis, A. E. 2001. The anatomy and physiology of teleosts, In *Fish Pathology* (R. J. Roberts, ed.). Philadelphia, USA: W. B. Saunders, 12-54.
- Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D., Andreu-Moliner E. 2003. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.*,56: 434-441.
- Siegfried, K.R., Nüsslein-Volhard, C. 2008. Germ line control of female sex determination in zebrafish. *Developmental Biology* 324:277-287.
- Srivastava, P., Singh, A. 2013. In vivo study of effects of dithiocarbamates fungicide (Mancozeb) and its metabolite ethylenethiourea (ETU) on fresh water fish *Clarius batrachus*. *J. Biol. Earth. Sci.* 3(2):B228-B235.
- Şişman, T., Geyikoğlu, F. 2010. Pcb 126'ya maruz kalmış zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarındaki sensorimotor hasarlar. *Tübvav bilim dergisi*, 3-1:61-66.
- Tarakçı, Ü., Türel, İ. 2009. Halk sağlığı amaçlı kullanılan pestisitlerin güvenilirlik standartlarının karşılaştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, Van, 20(1):11-18.
- Tiryaki, O., Canhilal, R., Horuz, S. 2010. Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 26(2): 154-169.
- Tisdale, W. H., Williams, I. 1934. Disinfectant. U.S. patent 1,972,96.
- Toros, S., Maden, S., Sözeri, S. 1999. Tarımsal savaş yöntem ve ilaçları. (genişletilmiş 3. baskı). A.Ü. ziraat Fakültesi yayınları NO:1508. Ankara.
- Turabi, M.S. 2007. Bitki Koruma Ürünlerinin Ruhsatlandırılması. Tarım İlaçları Kongre ve Sergisi, TMMOB Zir. Müh Odası ve TMMOB Kimya Müh Odası, Bildiriler Kitabı, s:50-61, 25-26.

- Uji, S., Kurokawa, T., Hashimoto, H., Kasuya, T., Suzuki, T. 2011. Embryogenic staging of fugu, *Takifugu rubripes*, and expression profiles of *aldh1a2*, *aldh1a3* and *cyp26a1*. *Dev. Growth Differ.*, 53(5): 715–725.
- Varnagy, L., Budai, P., Molnar, E., Takacs, I., Karpati A. 2000. Interaction of Dithane M-45 (mancozeb) and lead acetate during a teratogenicity test in rats. *Acta Vet Hung*, 48(1):113-24.
- Wittbrodt, J., Shima, A., Schart, M. 2002. Medaka-A Model Organism From the Far East. *Nature Rev. Genet.*, 31: 53-64.
- Xu, H., Yang, J., Wang, Y., Jiang, Q., Chen, H., Song, H. 2008. Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol.* 2;88(1):1-8.
- Yamanoue, Y., Miya, M., Matsuura, K., Miyazawa, S., Tsukamoto, N., Doi, H., Takahashi, H., Mabuchi, K., Nishida, M., Sakai, H. 2009. Explosive Speciation of Takifugu: Another Use of Fugu as a Model System for Evolutionary Biology. *Mol. Biol. Evol.*, 26(3): 623–629.
- Yavuz, H. 2007. Konya’da Satılan Ballardaki Bazı Pestisid Residülerinin Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Yokota, H., Kang, J., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T., Imada N., Tadokoro H., Honjo T. 2002. Effects of Bisphenol on the Reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environ. Toxicol.*, (6-10-1):812-8581.
- Yön, N.D., Akbulut, C., Kaymak, G., Kayhan F.E. 2015. Histopathological effects of Cadmium Exposure on Testis Tissue of Swordtail Fish, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 24 – No 6a.
- Yön, N.D., Akbulut, C. 2013. Acute effects of bisphenol a on testis tissue of guppy fish (*Poecilia reticulata*). *Elixir Aquaculture* 58,14728-14730.

ÖZGEÇMİŞ

Merve ABAR GÜROL 14.02.1991'de Kırıkkale'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bartın'da tamamladı. 2009 yılında Bartın Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2009 yılında başladığı Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2013 yılında bitirdi. Aynı zamanda 2013 yılında Gazi Üniversitesi Hastanesi Embriyoloji ve Histoloji Anabilim Dalında stajını tamamladı. 2014 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılında İş Güvenliği Uzmanı olarak iş hayatında görev almaya başladı ve halen İş Güvenliği Uzmanı olarak görevine devam etmektedir.