

Ham Petrolün Suda Çözünebilen Kısımlarının *Pelvicachromis pulcher* (Boulenger, 1901) (Cichlidae, Teleostei) Bağırsak ve Karaciğeri Üzerindeki Etkileri ^[1]

Özlem ÖNEN * & **  Özge GÜNDÜZ * Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ *

[1] Bu çalışma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararları'na göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu'nun 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütülmüştür

* Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, TR-35100 Bornova, İzmir - TÜRKİYE

** Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, TR-36000 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2010-3558

Özet

Petrokimyasal üretim süreçlerinin sağlığımız ve çevremiz üzerindeki zararlı etkilerinin ortaya konmasına katkıda bulunmak amacıyla, 15 gün süreyle %40'lık subletal konsantrasyonda ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına maruz bırakılan bir teleost türünün, *Pelvicachromis pulcher*'in bağırsak ve karaciğer dokularında gözlenen histopatolojik değişimler ışık mikroskobu ile araştırıldı. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, ham petrole maruz bırakılan örneklerin bağırsaklarında göze çarpan ülserasyon, deskuamasyon, lenfosit infiltrasyonu ve nekroz gibi ciddi histolojik değişimler not edildi. Karaciğerde steatosis, hemoraji, sinüzoidlerde genişleme ve özellikle piknotik ve karyoretik nükleuslarla karakterize edilen çarpıcı hepatosellüler bozulma olarak ayırt edilen belirgin deformasyonlar gösterdiği tespit edildi. Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının her iki dokuda da, beklenildiği üzere önemli ölçüde etkili olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar sözcükler: Ham petrol, *Pelvicachromis pulcher*, Bağırsak, Karaciğer, Histopatoloji

The Effects of Water Soluble Fractions of Crude Oil on The Intestine and Liver of *Pelvicachromis pulcher* (Boulenger, 1901) (Cichlidae, Teleostei)

Summary

In order to make a contribution to displaying of the harmful effects of the petrochemical production processes to our health and environment, it has been investigated the histopathological changes observed in the intestine and hepatic tissues of *Pelvicachromis pulcher*, a teleost fish, after a 15-day exposure to 40% sublethal concentrations of the water-soluble fractions of crude oil, by light microscopy. Several histological alterations such as prominent ulceration, desquamation, lymphocyte infiltration and necrosis, were noted for the intestinal tissue of the crude oil exposed animals when compared with controls. The liver was also shown marked deformative changes identified as steatosis, hemorrhage, dilatation of sinusoids and pronounced hepatocellular degeneration which was specially characterized pyknotic and karyorrhetic nuclei. It was concluded that the water soluble fractions of crude oil was drastically effected both of the tissues studied, as expected.

Keywords: Crude oil, *Pelvicachromis pulcher*, Intestine, Liver, Histopathology

GİRİŞ

Dünya enerji ve petrokimya sektörünün en önemli maddesi olan ve parafin, izoparafin, naften, olefin gibi hidrokarbonlar içeren ham petrol ve ürünlerinin yaygın kullanımına bağlı olarak oluşan çevresel kirlilik ve özellikle nakliye sırasında oluşabilecek kazalarla geniş alanlara yayıl-

ması, ekosistemde ciddi problemlere yol açmaktadır. Petrol tankerlerinin yol açtığı Amoco Cadiz (1978) ve Exxon Valdez (1989) facialarının çevrede oluşturduğu tahribatın izleri henüz silinmemişken, Nisan 2010'da Meksika Körfezi'nde Deepwater Horizon adlı petrol platformunda



İletişim (Correspondence)



+90 232 3112420



ozlem.onen@ege.edu.tr & ozlem.onen@hotmail.com

oluşan patlamalar sonucunda, günde yaklaşık 15 bin ton petrolün 900 km²'lik bir alana yayılmasıyla büyük bir çevresel tehdit oluştuğu bilinmektedir¹. Ham petrolün suda çözünmeyen kısmını oluşturan hidrokarbonlar, öncelikle sucul canlıları ve balıkları, besin zinciri uzantısında da diğer canlıları ciddi ölçüde etkilemektedir².

Teleostlar, günümüzün vazgeçilmez enerji kaynaklarından petrolün çıkarılma, rafinerizasyon ve kullanım süreçlerinde oluşan ve oluşabilecek büyük kazaların çevrede oluşturabileceği hasarların ayrıntılarıyla ortaya konabilmesi için çok kullanışlı model organizmalardır³. Temel besin kaynaklarından olan balıklarda ham petrolün etkilerinin belirlenebilmesi insan ve toplum sağlığı açısından da büyük önem taşır. Bu noktalardan hareketle gerçekleştirilen araştırmada, model organizma olarak seçilen *Pelvicachromis pulcher*'de ham petrolün suda çözünmeyen kısımlarının sindirim borusunun emilim yüzeyi olarak bağırsak ve detoksifikasyon merkezi olarak da karaciğer dokuları üzerindeki toksik etkilerinin belirlenmesi ve insan sağlığı üzerindeki olası etkilerin ortaya konmasına yönelecek çalışmalara ışık tutulması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Araştırmamız Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları için Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2008-49 Sayılı Raporu uyarınca yürütüldü. Ticari akvaryumculardan sağlanan 20 adet *P. pulcher* örneği 25±2°C sıcaklıktaki dinlendirilmiş şebeke suyuyla dolu iki akvaryuma eşit sayıda konularak 15 gün süreyle ortama alıştırdı. Alıştırma ve deneme süresince balıklar günde bir kez ticari yemle beslendi. Örnekler %40'lık konsantrasyonda ham petrolün suda çözünmeyen kısımlarına 96 saat maruz bırakıldı. %40'lık konsantrasyon, ham petrolün suda çözünmeyen kısımlarına maruz bırakılan *Astyanax* sp. ile yapılan çalışma baz alınarak belirlendi⁴. Deneme grubuyla kontrol grubu örnekleri MS 222 ile uyuşturuldu ve çıkartılan bağırsak, karaciğer dokularından alınan 4-6 µm kalınlığındaki kesitler hematoxilen-eozin ile boyanıp ışık mikroskopuyla incelendi.

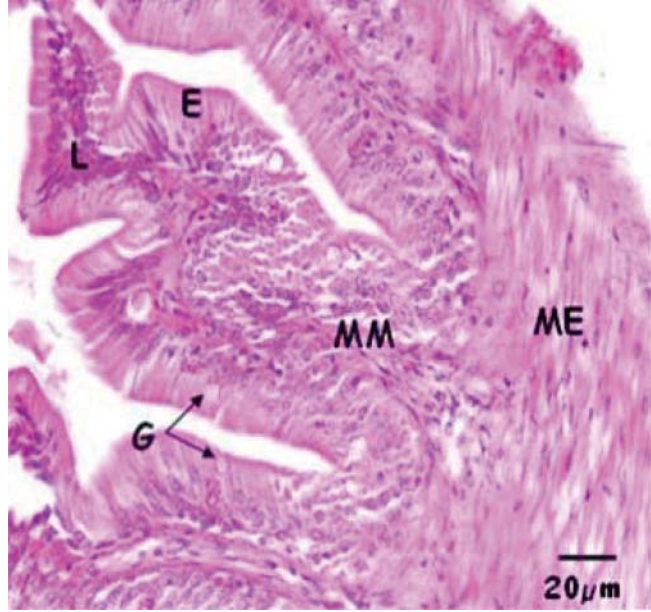
BULGULAR

Deneme ve kontrol gruplarında hiçbir ölüm vakası ve herhangi bir davranış değişimi gözlenmedi.

Kontrol grubu örneklerinde görüldüğü üzere *P. pulcher*'de gastrointestinal bölgenin geniş emilim yüzeyini oluşturan bağırsak, lümeninden dışa doğru mukoza, submukoza, muskularis externa ve seroza tabakalarına ayrılmaktadır (Şekil 1). Silindirik epitel hücreleriyle örtülü gevşek lifli bağ dokusundan (lamina propria) ibaret olan mukozada villüslerin ayrımı yapılamazken goblet hücreleri rahatça ayırt edilmektedir. İnce bir düz kas tabakası olan muskularis mukozanın hemen altında yine bağ dokusundan oluşan

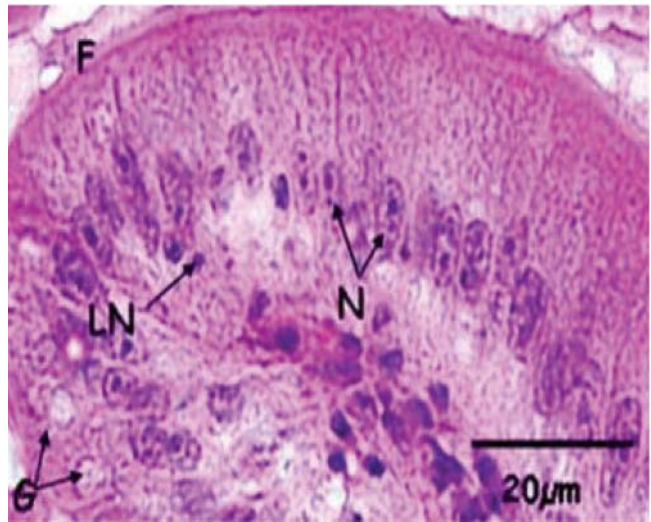
submukoza yer almaktadır. En dışta da enine-boyuna yerleşmiş kas dizgelerinden oluşan geniş bir tabaka, muskularis eksterna bulunmaktadır.

Mukoza epitel, hücre sınırları belirgin, uzamış şekilli, düzgün, genelde silindirik nukleuslarında 1-2 nukleolus bulunan tek sıralı, apikalde fırçası kenar özelliği taşıyan enterositlerin aralarındaki goblet hücreleri ve lenfositler ile tipik görünüm sergilemektedir (Şekil 2).



Şekil 1. Kontrol grubunda bağırsağın genel yapısı. Mukoza epitel (E) ve goblet (G) hücreleri, lamina propria (L), muskularis mukoza (MM) ve muskularis eksterna (ME) H&E

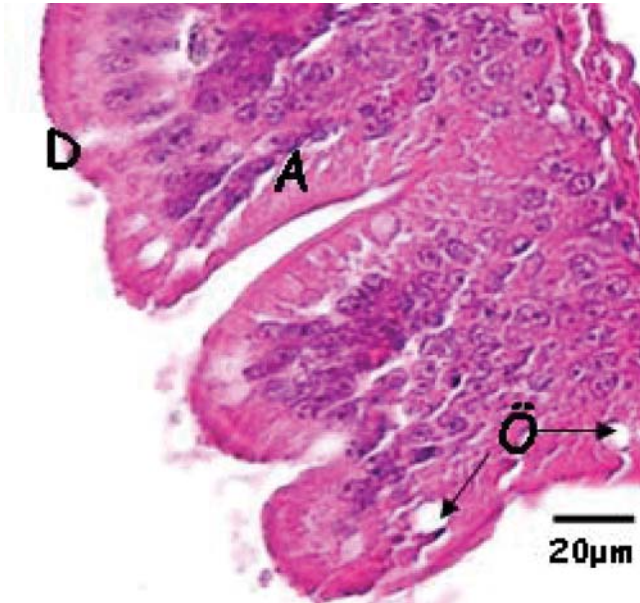
Fig 1. General histology of the intestine of the control group. Epithel cells (E) and goblet cells (G) of mucosa, lamina propria (L), muskularis mucosa (MM) and muskularis externa (ME), H&E



Şekil 2. Kontrol grubunda bağırsak epitel. Silindirik nukleuslarıyla (N), fırça kenar (F) özelliği taşıyan enterositler, goblet hücreleri (G) ve lenfositler (LN), H&E

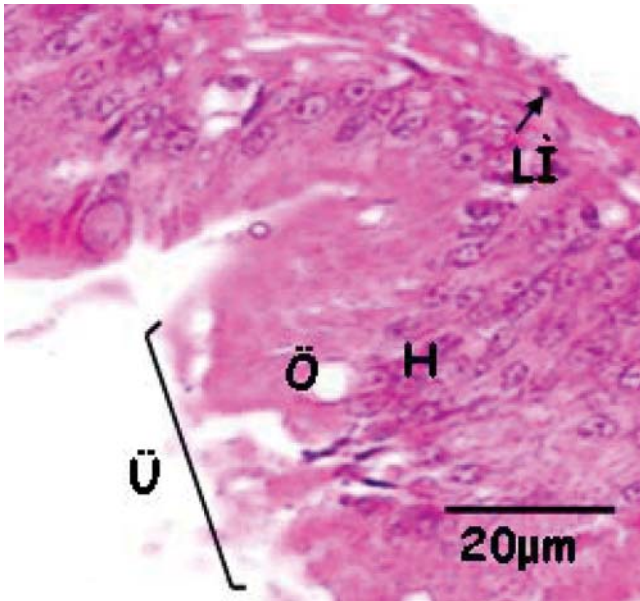
Fig 2. Intestinal epithelium of the control group. Columnar nuclei (N), enterocytes with brush border (F), goblet cells (G) and lymphocytes (LN), H&E

Ham petrolün suda çözünebilir kısımlarına maruz bırakılan örneklerin bağırsak epitel hücre sınırları ayırdedilemez haldedir. Epitelde ayrılmalar ve deskuamasyon (Şekil 3) izlendi, yer yer nekroz oluşumunu kuvvetle düşündüren parçalanmalar not edildi; bu görünüme apikalde bozulan fırça kenar yapısı ve yoğun ülserasyon eşlik etmektedir (Şekil 4). Mukozada gözlenen hemoraji ve ödemin yanısıra lamina propriada lenfosit infiltrasyonu söz konusudur (Şekil 3, 4).



Şekil 3. Deneme grubu bağırsak epitel hücrelerinde ayrılmalar (A), deskuamasyon (D) ve mukozada ödem (Ö), H&E

Fig 3. Separation of intestinal epithelial cells (A), desquamation (D) and mucosal edema (Ö) in the intestinal tissue of the experimental group, H&E

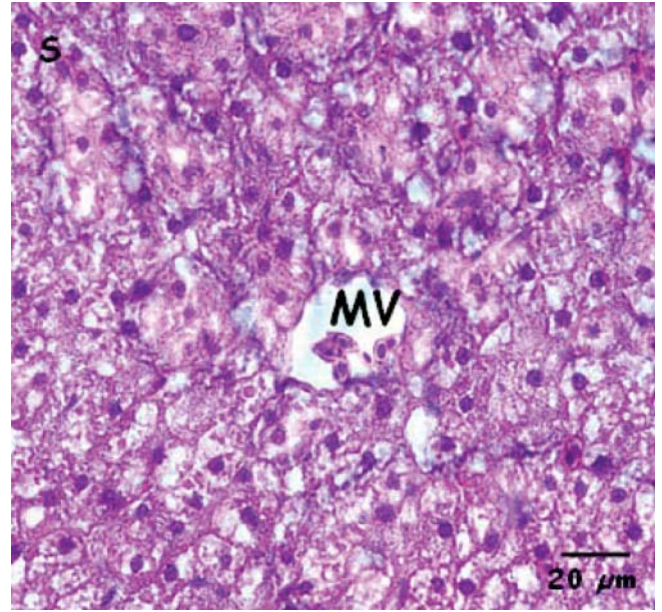


Şekil 4. Deneme grubu bağırsak epitel hücrelerinin apikalinde yoğun ülserasyon (Ü), mukozada ödem (Ö), hemoraji (H) ve lamina propriada lenfosit infiltrasyonu (Lİ), H&E

Fig 4. Intense apical ulceration (U), mucosal edema (Ö) and infiltration of lymphocytes (Lİ) into the lamina propria in the intestinal tissue of the experimental group, H&E

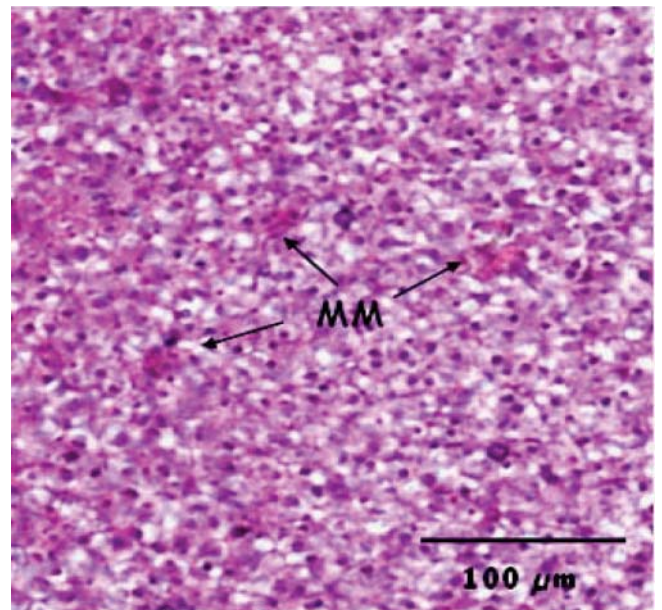
Kontrol grubuna ait *P. pulcher* örneklerinde karaciğer dokusu, merkezi ven etrafında belirgin koyu nukleuslara sahip ve hücre sınırları düzgün, poligonal hepatositler ile bu hücrelerin aralarında uzanan sinüzoidlerden oluşmaktadır (Şekil 5). Çok az sayıda ve dar alanlardaki melanomakrofaj merkezleri zorlukla seçilebilmektedir (Şekil 6).

Ham petrolün suda çözünebilir kısımlarına maruz bırakılan karaciğer dokusunda steatozis (yağlanma) bulguları



Şekil 5. Kontrol grubunda hepatositlerden ayrıntı, merkezi ven (MV) ve sinüzoidler (S), H&E

Fig 5. Details of hepatocytes, central vein (MV) and sinusoids (S) at control group, H&E

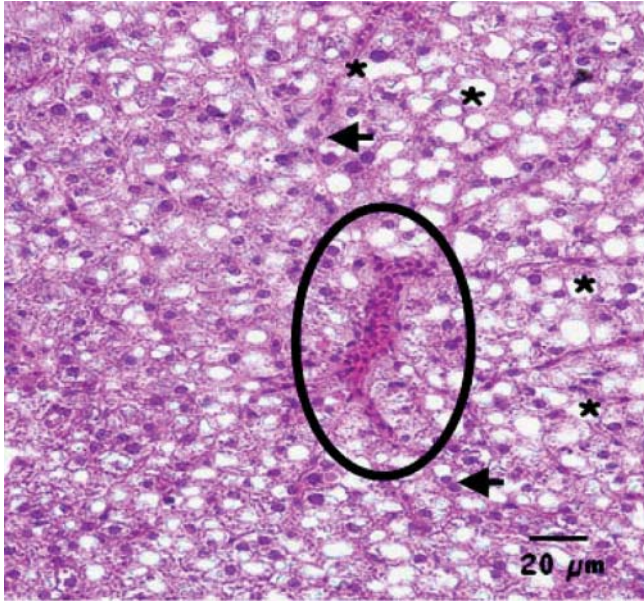


Şekil 6. Kontrol grubu karaciğer parankimasında melanomakrofaj merkezleri (MM), H&E

Fig 6. Melanomacrophage centers (MM) in the liver parenchyma of control group, H&E

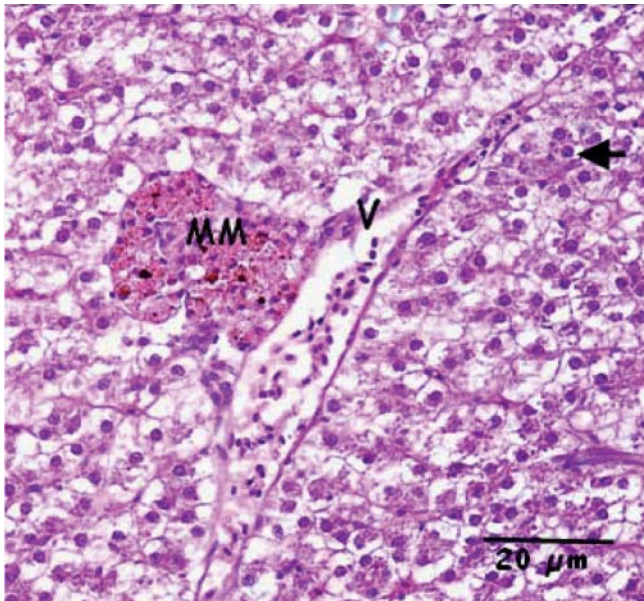
tipiktir (Şekil 7, 9). Bunun sonucu olarak hepatositler normal şekillerini yitirmiş, karyoretik (Şekil 7-9) ve piknotik (Şekil 9) yapıdaki nukleuslar hücrelerin periferine çekilmiştir.

Sinüzoidlerdeki kongesyon ve dilatasyonun (Şekil 7) yanı sıra yer yer nekrotik (Şekil 9) alanlara rastlanmaktadır. Kontrol grubundan farklı olarak özellikle sinüzoidler etrafındaki melanomakrofaj oluşumları dikkati çekmektedir (Şekil 8, 9).



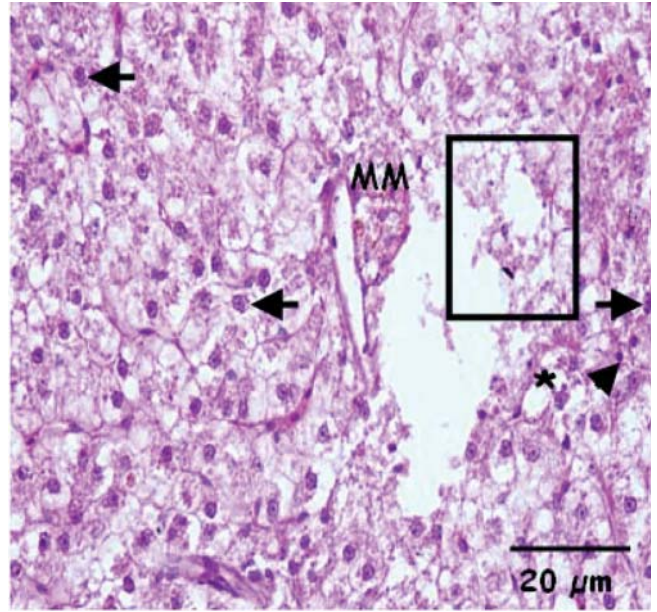
Şekil 7. Deneme grubu karaciğerinde steatozis (*) ve kongesyon (daire içerisinde), karyoretik nukleuslara (oklar) sahip hepatositler, H&E

Fig 7. Steatosis (*) and congestion (encircled), hepatocytes with karyorrhetic nuclei (arrows) in the liver of the experimental group, H&E



Şekil 8. Deneme grubu karaciğerinde sinüzoidlerde dilatasyon (V), melanomakrofaj merkezleri (MM) ve karyoretik nukleuslara (ok) sahip hepatositler, H&E

Fig 8. Dilatation of sinusoids (V) and melanomacrophage centers (MM), hepatocytes with karyorrhetic nuclei (arrow) in the liver of the experimental group, H&E



Şekil 9. Deneme grubu karaciğerinde nekrotik alanlar (dikdörtgen içerisinde), melanomakrofaj merkezleri (MM), karyoretik (oklar) ve piknotik (P, ok başı) nukleuslu hepatositler ve steatozis (*), H&E

Fig 9. Necrotic areas (rectangled), melanomacrophage centers (MM), hepatocytes with karyorrhetic (arrows) and picnotic (arrow head) nuclei, and steatosis (*) in the liver of experimental group, H&E

TARTIŞMA ve SONUÇ

Organizmaya giren yabancı maddelerin izlediği ana yollardan biri olan sindirim sistemi ⁵, hem doğrudan hem de besinler aracılığı ile dolaylı maruziyet yüzeyi olarak özellikle önemlidir. Gastrointestinal sistem üzerinden vücuda giren toksik maddelerin, sistemin geniş emici yüzeylerinde çeşitli değişimlere neden oldukları bilinmektedir ⁶.

Toksik kimyasalların bağırsak yüzeyinden absorpsiyonu sonucu oluşan ve epitelde atrofi, parçalanma, vakuolizasyon, ödem ve nekroz oluşumu ile ülser, hemoraji; lamina propria lenfosit infiltrasyonu gibi histopatolojik değişimler birçok balık türünde rapor edilmiştir ⁷⁻¹⁰.

Deneme grubu örneklerinde gastrointestinal sistemde hemen göze çarpan değişimler epitel hücre sınırlarının seçilememesi ve apikalde fırçamsı kenar yapısındaki belirgin bozulmaya eşlik eden ülseratif görünümdür (Şekil 4). Epitel yer yer adeta parçalanmış gibi izlenmekte ve enterositlerin aralarında oldukça geniş vakuoller görülmektedir (Şekil 3). Bu doğrultuda bulgularımız mevcut literatüre uygundur. Boşluklu görünüm ödemin kanıtı olarak değerlendirilmiş ve bazı bölgelerdeki çok geniş vakuoller nekroz işareti olarak yorumlanmıştır (Şekil 3, 4). Organofosfat bileşiklerinin *Corydoras paleatus* gastrointestinal sistemi üzerindeki etkilerine yönelik olarak yapılan bir araştırmada ¹¹ enterositlerin apikal bölgelerinde yer alan vakuoller, organofosfor bileşikler içerdiği düşünülen lipoid vakuoller olarak tanımlanmış ve içeriklerinde bulunabileceği düşünülen organofosfor bileşiklerinin, açık durumunda lipidle-

rin yıkılması halinde tekrar toksikokinetik sürece girerek ikincil bir kontaminasyon yaratabileceği tartışılmıştır. Benzer bir sürecin, ham petrol içeriği için geçerli olup olmayacağına anlaşılabilmesi için histokimyasal yöntemler uygulanması gerekmektedir. Sadece ışık mikroskobu gözlemlerinden oluşan bir çalışmada ancak, izlenen histopatolojik değişimlerin bağırsak dokusunun toksik bileşenler için önemli bir absorpsiyon yüzeyi olduğunu bir kez daha belirlediği söylenebilir.

Gastrointestinal sisteme bağlı bez olarak karaciğer, çok önemli metabolik işlevlerin ve zehirsizleştirme süreçlerinin merkezidir ¹²⁻¹⁴. Karaciğer dokusunda oluşan değişimlerin tüm omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da sağlığın değerlendirilmesinde belirleyici olduğu bilinmektedir ⁴.

Memelilerdeki lobüler karaciğer yapısı teleostlarda genellikle izlenmez. Kontrol grubu *P. pulcher* örneklerinde karaciğerin genel yapısı bu bilgiye uygundur, karaciğerde lobüler görünüm izlenmemekte; hepatositler de kordon şeklinde bir dizilim sergilememektedir.

Deneme grubu örneklerinin karaciğerlerinde izlenen en tipik bulgu yağlanma ve buna bağlı olarak oluşan hepatosit deformasyonu ile karyoretik nukleuslardır (*Şekil 7-9*). Bu bulgular düşük ve yüksek dozda ham petrolün suda çözünmeyen kısımlarına maruz bırakılan *Oncorhynchus gorbuscha*'da da rapor edilmiştir ¹⁵. *Anguilla anguilla* üzerinde yapılan bir çalışmada, yağlanmaya sudaki kontaminasyonun neden olduğu bildirilerek bu sürecin karaciğerde metabolizmanın bozulması sonucunda fazla miktarda trigliserit birikimi ile gerçekleştiği bildirilmiştir ¹⁶. *Oreochromis niloticus*'da kurşun ve kalsiyum maruziyetine bağlı olarak hepatositlerde vakuolizasyon ve konjesyonun yanı sıra bazı alanlarda piknotik nukleusların olduğu tespit edilmiştir ¹⁷.

Yer yer izlenen nekrotik oluşumlar karaciğerde toksisiteye bağlı olarak meydana gelen tipik değişimlerdir ^{18,19}. Hücresel membran bütünlüğünün bozulmasının enzimatik inhibisyon sonucu olduğu ve bunun karaciğerin protein-karbonhidrat sentezinde bozulmalara neden olduğu bildirilmekle beraber ²⁰, ışık mikroskobu düzeyinde bu konuda bir yorum getirilmesi olası değildir.

Deneme grubu karaciğer örneklerinde izlenen önemli bir bulgu, özellikle sinüzoidler etrafında yerleşmiş olan melanomakrofaj merkezlerinin çok belirgin biçimde genişlemesidir (*Şekil 8, 9*). Memelilerdeki fagositik hücrelere eşdeğer olan ²¹ melanomakrofajlar, toksisite ve stres varlığını işaret eden önemli biyoişaretleyicilerdir ²². Buna göre, uygulamanın beklenildiği üzere belirgin bir toksik stres oluşturduğu sonucuna rahatça varılabilir.

Bu çalışma, petrol kirliliği ile ilgili önlemlerin çok daha ciddi olarak ele alınması ve bu tür kirlenmelerle etkin şekilde mücadele edilebilmesi için, veri tabanlarının genişletilmesi bağlamında değerlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1. Kasten K:** Meksika Körfezi ham petrole bulandı. <http://www.dw-world.de/dw/article/0,,5512795,00.html>, *Erişim tarihi:* 27.04.2010.
- 2. Uysal A:** Ham petrol fraksiyonlarının biyolojik bozunma sonrası fizikokimyasal özelliklerinin değişimi. *Yüksek Lisans Tezi*, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2006.
- 3. Ganiyat AG:** The toxicological evaluation of sewage effluents and pharmaceuticals with the use of zebrafish as a model organism. Master of Science Programme in Veterinary Medicine for International Students Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science Swedish University of Agricultural Sciences, Report No: 71, Uppsala, 2008.
- 4. Akaishi FM, Silva de Assis HC, Jakobi SCG, Eiras-Stofella DR, St-Jean SD, Courtenay SC, Lima EF, Wagener ALR, Scofield AL, Oliveira Ribeiro CA:** Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. *Arch Environ Contam Toxicol*, 46, 244-253, 2004.
- 5. Uçar A, Atamanalp M:** Balıklarda toksikopatolojik lezyonlar I. *Atatürk Üniv Zir Fak Derg*, 39 (2): 255-261, 2008.
- 6. Vural N:** Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73, 31-177, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 2005.
- 7. Velmurugan B, Selvanayagam M, Cengiz EI, Unlu E:** The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *J Environ Sci Heal B*, 42, 157-163, 2007.
- 8. Mohamed FAS:** Histopathological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from lake Qarun, Egypt. *World J Fish & Marine Sci*, 1 (1): 29-39, 2009.
- 9. Kruatrachue M, Rangsayatorn N, Pokethitiyook P, Upatham ES, Singhaka S:** Histopathological changes in the gastrointestinal tract of fish, *Puntius gonionotus*, fed on dietary cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol*, 71, 561-569, 2003.
- 10. Bayram Y, Yılmaz M, Ersan Y, Koç E, Baysal A:** Toxic effects of cobalt II chloride on tissue histopathology and serum proteins in *Capoeta capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1772). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-B): S259-S263, 2010.
- 11. Fanta E, Sant'anna Rios F, Romão S, Vianna ACC, Freiburger S:** Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2 (54): 119-130, 2003.
- 12. Tamaru CS, Cole B, Bailey R, Brown C, Ako H:** A manual for commercial production of Swordtail, *Xiphophorus helleri*. University of Hawaii Sea Grant Extension Service, School of Ocean Earth Science and Technology (Honolulu, Hawaii), CTSA Publication Number 128, pp. 1-38, 2001.
- 13. Takashima F, Hibiya T:** An atlas of fish histology, normal and pathological features, 2nd ed, 100-112, 195, Kodansha Ltd., Tokyo, 1995.
- 14. Weisman JL, Miller DL:** Lipoid liver disease and steatitis in captive sapphire damselfish *Pomacentrus pavo*. *Acta Ichthyol Piscatoria*, 36 (2): 99-104, 2006.
- 15. Brand DG, Fink R, Bengeyfield W, Birtwell IK, Mcallister CD:** Salt water-acclimated Pink Salmon Fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress related visceral lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of the water-soluble fraction of north slope crude oil. *Toxicol Pathol*, 29 (5): 574-584, 2001.
- 16. Pacheco M, Santos MA:** Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicol Environ Saf*, 53, 331-347, 2002.
- 17. Singhadach P, Jiraungkoorskul W, Tansatit T, Kosai P, Ariyarsrijit C:** Calcium pre-exposure reducing histopathological alteration in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) after lead exposure. *J Fish Aquat Sci*, 4 (5): 228-237, 2009.
- 18. Arellano JM, Storch V, Sarasquete C:** Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the *Senegales sole*, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 44, 62-72, 1999.

19. İşisağ Üçüncü S, Ergen G, Önen Ö, Kolbaşı Tekkan B, Üreten M, Boz E, Seferoğlu K, Gökçe B: Dioktil adipat'ın (DOA) *Labidochromis caeruleus* Fryer, 1956 (Cichlidae, Teleostei) karaciğer histolojisi üzerindeki etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (Suppl-B): S197-S203, 2010.

20. Manahan SE: Water Pollution Environment Chemistry. First ed., Lewis

Publishers, London,1991.

21. Joseph M, Groff VMD: Neoplasia in fishes. *Vet Clin Exot Anim*, 7 (3): 705-756, 2004.

22. Agius C, Roberts RJ: Melano-macrophage centers and their role in fish pathology. *J Fish Dis*, 26 (9): 499-509, 2003.