



Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Derleme

Pestisit Kaynaklı Kardiyak Toksikite Araştırmalarında Zebra Balığı (*Danio rerio*)

 Sezgi ARMAN*

Biyoloji Bölümü, Fen-Edebiyat Fakültesi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, TÜRKİYE

* Sorumlu yazarın e-posta adresi: sezgiarman@gmail.com

DOI : 10.29130/dubited.528427

ÖZET

Çevresel kirleticiler, karasal ve sucul ekosistemlerde bozulmalara sebep olmalarının yanı sıra pek çok sağlık sorununa da yol açmaktadır. Pestisitler, devamlı kullanımla çevreye yayılan, hareket eden, farklı çevre fazlarında karşılaştıkları hedef dışı organizmalarda biyolojik etki gösteren kirleticiler olarak bilinmektedir. Pestisitlerin kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkili oldukları düşünülmektedir. Bu kimyasalların kalpte meydana getirebilecekleri olası etkilerin araştırılmasında laboratuvar çalışmalarının önemi büyüktür. Zebra balığı (*Danio rerio*), kardiyak toksisite çalışmalarında gerek embriyonik gerekse ergin dönemde araştırmacılara sayısız kolaylık sağlayan bir model organizma olarak kabul edilmektedir. Pestisitlerin kalp üzerindeki toksik etkilerinin ortaya konması ve etki mekanizmalarının araştırılmasında son yıllarda zebra balıkları sıklıkla kullanılmaktadır. Bu derlemede, pestisit maruziyetine bağlı ortaya çıkan kalp anomalilerinin değerlendirilmesinde neden son yıllarda zebra balığının model sistem olarak kabul edildiğine ayrıntıları ile değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Zebra balığı, *Danio rerio*, pestisit, kalp, toksisite

Zebrafish (*Danio rerio*) In Pesticide-Induced Cardiac Toxicity Research

ABSTRACT

Environmental pollutants give rise to several health problems beside degenerations in terrestrial and aquatic ecosystems. Pesticides are the chemicals that spread to the environment through continuous usage, move and show biological effects on non-target organisms that they encounter in various environmental phases. It has thought that pesticides are also related to cardiovascular diseases. Laboratory works are essential to search the possible effects of these chemicals on heart. Zebrafish (*Danio rerio*) is considered as a model organism that presents numerous advantages to researchers on their both adult and embryonic stages on cardiac toxicity studies. In recent years, zebrafish have been often preferred to reveal the toxic effects of pesticides on the heart and to investigate their modes of action. In this review, it was mentioned in detail that why in recent years zebrafish is considered as a model system to evaluate the heart abnormalities that occurs due to pesticide exposure.

Keywords: Zebrafish, *Danio rerio*, pesticide, heart, toxicity

I. GİRİŞ

Modern dünyada hızla artan insan nüfusunun ihtiyaçları doğrultusunda gerek tarımsal gerekse Endüstriyel alanda yapılan açılımlarla artan üretim süreçleri sonucunda, düşük maliyet ve kolay ulaşılabilirlik adına pek çok kimyasal madde kullanılmaktadır. Bu yabancı kimyasallar üretim ve kullanımları sırasında, kaza sonucu veya atık olarak çevreye karışmakta, hareket etmekte, hatta birikebilmektedir. Çok da karmaşık olmayan süreçlerle besin zinciri, dolaylı ya da doğrudan maruziyet ile insan dahil pek çok yüksek organizasyonlu organizmada istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. Çevreye yayılan kirleticiler, tüm dünyada sucul ve karasal ortamları kirleten, hem fiziksel olarak bozulmalara yol açan hem de karşılaştığı biyolojik sistemlere etki ederek doğal süreçleri aksatan kimyasallardır.

Bu etkilere yol açtığı bilinen ve her yıl dünya genelinde büyük miktarlarda kullanımına başvuru olan bu kimyasalların önemli bir kısmını pestisitler oluşturur. Pestisitler, genel anlamıyla ‘tarım ilacı’ veya ‘haşere öldürücü’ olarak bilinirler ve tarımsal üretimde verim artışı sağlarlar. Ancak, zirai alanlarda geniş ölçüde kullanımı olan pestisitlerin, uygulama alanlarında sınırlı kalmayıp çevrenin farklı fazlarına karıştığı uzun süredir bilinmektedir [1]. Solunum, sindirim veya temas yoluyla maruz kalınan pestisitlerin insanda meydana getirdiği olumsuz etkileri hakkındaki bilgiler epidemiyolojik verilerle genişletilebilse de, laboratuvar deneyleriyle ulaşılan sonuçlar, bu kimyasalların etki mekanizmalarından güvenli kullanım sınırlarının belirlenmesine kadar bilgi birikimini önemli ölçüde artırmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıklar, tüm dünyada ölümlere yol açan önemli bir sağlık sorunu olarak bilinmektedir. Hipertansiyon, diyabet, kolesterol veya sigara kullanımı [2] gibi etkilerin dışında, kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülen diğer bir önemli etken de inflamasyon ve oksidatif stresi tetikleyerek risk faktörü oluşturan pestisitlerdir [3,4]. Akut ve kronik pestisit maruziyetinin insanda kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğuna dair raporlar bulunmakta; ancak mevcut çalışmaların yetersiz olduğu kaydedilmektedir [5-7].

Bu derlemede, pestisit maruziyetine bağlı kalp anomalilerinin, laboratuvar çalışmaları ile değerlendirilerek, bu kimyasalların kardiyovasküler sistem gelişimi üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkiler ile ilgili verilerin artırılmasında neden son yıllarda zebra balığının model sistem olarak kabul edildiğine değinilmiştir.

A. PESTİSİTLERİN ÇEVRESEL KONTAMİNASYONU HEDEF DIŞI TÜRLERİ ETKİLER

Yaygın biçimde, bitki koruma ürünleri olarak bilinen pestisitler, haşere ve böcekleri öldürmelerinin yanında, fare ve sıçan gibi hastalık vektörlerinin kontrolünde de kullanılmaktadır [8]. Sayıları 20.000’leri bulan kayıtlı pestisitler [9], farklı parametrelere göre sınıflara ayrılırlar. Bunlardan en çok kullanılan sınıflandırma metotları; kimyasal yapılarına ve hedef canlı gruplarına göre olanlardır. Örneğin; yapısında organik klor içeren pestisitler organoklorlu olarak sınıflandırılırken; kimyasal yapı farkı gözetmeksizin böcek öldüren pestisitler, insektisit olarak gruplandırılmaktadır.

Özellikle zirai zararlılarla mücadelede etkin şekilde kullanılan pestisitler, yalnızca uygulama alanlarında kalmayıp atmosfer, sucul alanlar ve sedimente kadar ulaşabilirler. Buna ek olarak, bu

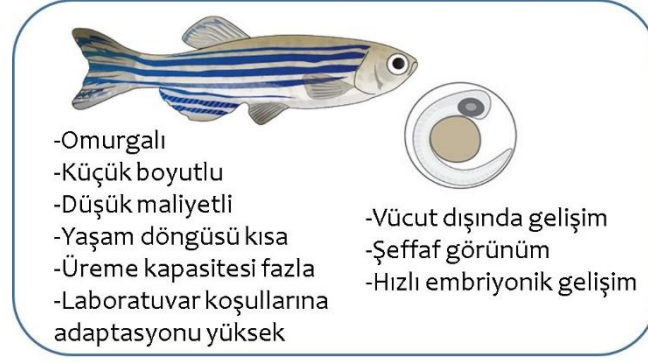
kimyasalların hedef özgülüklerinin yeteri kadar gelişmiş olmadığını ve karşılaştıkları hedef dışındaki canlılarda istenmeyen biyolojik etkilere yol açtıklarını da ortaya koyan çok sayıda araştırma bulunmaktadır [10-15].

İnsanlarda pestisit maruziyeti sonucu ortaya çıkan etkilerin raporları çoğunlukla sadece hastane verilerine dayanmaktadır [16-18]. Pestisitler, çok çeşitli kimyasalları içeren, farklı temas yolları ile farklı biyolojik etkiler yapabilen kirleticiler olduğundan, insanlarda meydana getirdikleri sağlık sorunlarını net biçimde ortaya koymada güçlükler yaşanmaktadır. Bu sebeple deney hayvanları ile laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalara başvurulmaktadır.

Laboratuvar şartlarında *in vivo* denemelere imkân sağlayan, karmaşık biyolojik olayların incelenmesi, çevresel toksikoloji çalışmaları, hastalıkların araştırılması, ilaçların ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gibi pek çok süreç ile ilgili bilgi edinilebilmesi için etik uygunluk çerçevesinde çalışılabilen canlılara model organizmalar denir. Model organizmalar, genetik ve deneysel olarak araştırmacılara kolaylık sağlayan avantajlı türlerdir. Bu türlerden bazıları; *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus gallus* ve *Mus musculus*'tur. Bu türlerin arasında *D. rerio* (zebra balığı), bir model organizmadan beklenen özelliklerin pek çoğunu bir arada taşıması nedeniyle popülerliğini artırmıştır. İnsanla olan güçlü genetik ilişkiler ile moleküler sinyal yollarındaki anlamlı benzerlik, zebra balığını başta gelişim biyolojisi [19], toksikoloji [20], genetik [21], çevre bilimi [22], farmakoloji [23], klinik öncesi araştırma [24] ve ilaç geliştirme [25] olmak üzere biyolojinin pek çok alanında kullanılan model canlılar listesinin üst sıralarına koymamızı sağlamaktadır.

B. ZEBRA BALIĞININ SAHİP OLDUĞU EŞSİZ ÖZELLİKLER ARAŞTIRICILARA PEK ÇOK AVANTAJ SAĞLAR

Zebra balığı günümüzde iyiden iyiye 'laboratuvar fareleri'nin yerini almaya aday, araştırmacılara sayısız avantaj ve çalışma kolaylığı sağlayan bir omurgalı hayvan modelidir. Erginleri 3-5 cm kadar olabilen bu küçük balık, laboratuvar şartlarında fazla yer kaplamadan, düşük maliyetle ve zahmetsizce yaşatılabilmektedir. Anavatanı Ganj Nehri olan tropik zebra balığı, düzenli ışık rejimi ile laboratuvar koşullarında çoğaltılabilir. Erişkin bir dişi haftada yaklaşık 200 adet yumurta verebilmektedir. Şeffaf koryon içerisinde ve anne vücudu dışında gelişimlerini sürdüren embriyoların embriyogenez süreçleri, araştırmacılar tarafından rahatlıkla izlenebilir. Memeli modellerle kıyaslandığında zebra balığı, yüksek sayıda yavru verme, dış ortamda ve hızlı gelişim gösterme, üreme döngüsünün kısa oluşu ve sınırlı laboratuvar alanında çok sayıda bireye rahatça bakabilme açısından üstünlük sağlamaktadır [26] (Şekil 1).



Şekil 1. Zebra balığının model organizma olarak kabul edilmesini sağlayan bazı avantajlar.

C. ZEBRA BALIKLARI FARKLI DİSİPLİNLERDE BAŞLICA ARAŞTIRMA MATERYALİ

OLARAK KULLANILIR

Eşeyssel olgunluğa 3-4 ay gibi kısa bir sürede ulaşan zebra balıklarının embriyoları, vücut dışında gelişmelerinin yanı sıra şeffaf görünümleri ile de gelişim çalışmaları başta olmak üzere diğer pek çok araştırma alanı için inanılmaz modellerdir. Embriyonik gelişim yaklaşık bir hafta içerisinde tamamlandığından, araştırmacılar sonuçlara çok hızlı ulaşabilirler. Yalnızca birkaç milimetre boyutundaki embriyo ve larvalar, petri kapları veya kuyucuklu plakalarda yer kaplamadan gelişmeye bırakılabilirler [27,28].

Zebra balığının genomunun tamamı sekanslanmış ve insanla yüksek oranda genetik benzerlik taşıdığı ortaya konmuştur [29]. İnsandaki hastalıklarla ilişkili genlerin %70'ten fazlasının zebra balığındaki işlevsel homologları olduğu tahmin edilmektedir [30]. Bu durum zebra balığının genetik araştırmalar için de tercih edilme nedenlerinin başında gelmektedir. Bu genlerin ekspresyon düzeylerini etkileyen mekanizmaların araştırılması, tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi veya söz konusu etmenin ortadan kaldırılmasını sağlayan süreçlerin aydınlatılması için önemlidir.

Zebra balıklarının başlıca materyal olduğu diğer bir disiplin toksikolojidir. Gerek ilaç gerekse çevresel kirlenmelerin yol açtığı organ, doku ve hücresel toksisite araştırmalarında sıklıkla kullanılırlar. İnsan ile genomlarının yüksek homolojisi aynı zamanda ilaç yanıtları ve kimyasalların bağlantı hedef bölgelerinin büyük oranda korunmuş olduğunu da işaret etmektedir [31,32]. Küçük boyutlu olmaları düşük hacimli test solüsyonu gereksinimini ve dolayısıyla da az miktarda toksik atık oluşmasını sağlar. Organizma ve organ düzeyinde meydana gelen değişimler mikroskop altında düşük büyütme güçlerinde dahi kolaylıkla izlenebilmekte; ayrıca floresan boyama ve *in situ* hibridizasyon gibi alternatif yöntemler de rahatça uygulanabilmektedir [33,34].

Embriyonik dönemde maruz kalınan kimyasalların sebep olduğu akut etkiler zebra balıklarıyla yapılmış pek çok çalışmada ortaya konmuş ve hala konulmaya devam etmektedir. Özellikle organ düzeyindeki anomalilerin araştırılmasında zebra balıkları çok kullanışlı modellerdir [35-37].

D. ZEBRA BALIĞI KARDİYOASKÜLER ÇALIŞMALARDA TERCİH EDİLEN HAYVAN

MODELİDİR

Zebra balıklarında kalp atışları, döllenmeden sonraki yaklaşık 22. saatte başlamaktadır. 48. saate gelindiğinde ise kardiyovasküler sistem tamamen işlevsel hale gelir ve iyon kanalları ile metabolik süreçlerin hepsi aktifleşir durumdadır [38]. Kalp atım hızı, kontraktilite, kalp ritmi gibi kadiyak işlevler ile kalbin genel morfolojisi, odacıkların durumu, 48 saatlik şeffaf embriyoda, basit bir ışık mikroskobu ile kolayca izlenebilmektedir [39,40].

Şeffaf yapının kalbin kolayca görüntülenmesine izin vermesi, genetik manipülasyonlardaki olanaklar ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili genlerin insanla olan yüksek orandaki benzerliği, zebra balığının kardiyovasküler araştırmaların gözde hayvan modeli olmasını sağlamıştır [21,41]. Bunlardan başka, diğer hiçbir omurgalı modelde olmayan bir özellik, çok küçük boyutlu zebra balığı embriyo ve larvalarının, ilk yedi günlük süreçte oksijenin pasif difüzyonuna izin vererek, özellikle kalp ve dolaşım kusurlarına rağmen 4-5 gün boyunca daha aerobik süreçleri etkilenmeksizin yaşamlarını sürdürebilmeleridir [42-45]. Kalpteki elektriksel aktiviteden sorumlu ERG (*Ether-a-go-go* related gene) potasyum kanalları, zebra balıkları ile insan arasında kuvvetli homoloji gösterir ve küçük kemirgenlerin aksine, bu kanallar zebra balıklarında insandaki gibi kalp repolarizasyonunda işlevseldir [46-48]. Bunun yanında, kalp gelişimi sırasında görevli olan genlerin pek çoğu insan ve zebra balığı arasında korunmuş haldedir. Bunlardan *GATA4*, *GATA6*, *MYH6*, *NKX2.5*, *TBX20* ve *HAND2* genlerinde oluşturulan tek gen mutasyonları sonucu, zebra balıklarında insandakine benzer biçimde sendromik olmayan kalp kusurlarının ortaya çıktığı bildirilmiştir [45]. Örneğin; *TBX20* mutasyonlu hastada atriyal ve ventriküler septal defekt izlenirken, aynı genin mutasyonunun zebra balığında anormal kasılma, dolaşımın durması, ödem, anormal odacık morfolojisi ile anormal kalp tüpü kıvrılması meydana getirdiği kaydedilmiştir [45,49]. Bu özellikler sayesinde, kalpte meydana gelen çeşitli anomalilerin gelişim süreçlerinin aydınlatılmasında zebra balıkları yararlı bir kardiyovasküler sistem aracı olarak karşımıza çıkmaktadır [41].

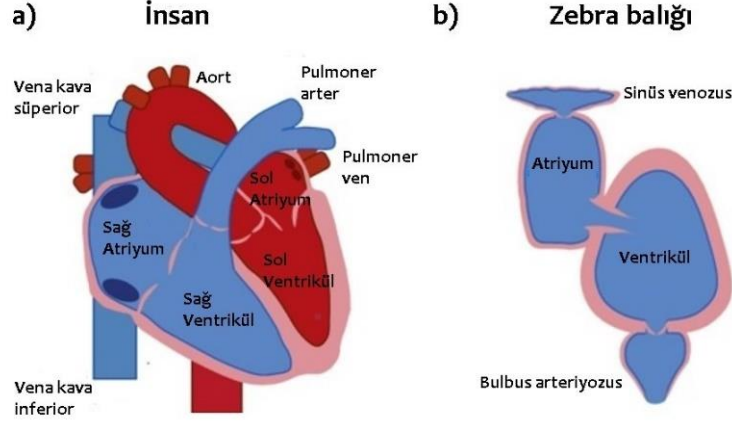
E. KALBİN HAYATİ FONKSİYONU VE İNSAN İLE ZEBRA BALIĞI KALPLERİNİN GENEL

ANATOMİLERİ

Kalp, omurgalı gelişimi sırasında ilk oluşan ve işlevsel hale gelen organdır. Doğum öncesi atımlarına başlayan kalp, canlının yaşamı boyunca çalışmasını durmaksızın sürdürür. Kalp, dolaşım sistemiyle tüm vücuda pompaladığı kan ile dokuların oksijen ve besin ihtiyacını karşılama yanında, karbondioksit ve metabolizma atıklarının da dokulardan toplanmasını sağlar. Bu özelliği ile hayati önem taşıyan bir organdır.

Embriyogenez sırasında, kadiyak progenitör hücrelerin özelleşip farklılaşmalarından, embriyonik kalp tüpünün oluşumuna ve nihayetinde kasılarak tüm vücuda kan pompalayabilen çok odacıklı bir kalp formuna dönüşmesini sağlayan bir dizi dinamik ve karmaşık moleküler yolak söz konusudur [50]. İnsan kalbi, bölmelerle sağ ve sol olmak üzere birbirlerinden ayrılmış iki atriyum ve iki ventrikülden meydana gelir. Kalbe giriş-çıkış yapan beş adet önemli damar bulunmaktadır. İnsan vücudunun en büyük arteri olan aort, akciğerlerde oksijenlenerek kalbe dönen kanın vücuda iletiminden sorumludur. Pulmoner arter, oksijen bakımından fakir kanı temizlemek üzere akciğerlere ileten kalbin sağ

ventrikülünün tabanından başlayan damardır. Pulmoner ven ise oksijence zenginleşen kanı akciğerlerden kalbin sol atriyumuna taşımakla görevlidir. Vena kava süperior, üst ana toplardamar olarak da bilinir ve baş, boyun gibi vücudun üst bölgelerinden gelen kanı sağ atriyuma taşırken vena kava inferior ise bacaklar, pelvis ve karın kısımlarından alınan venöz kanı sağ atriyuma iletmektedir (Şekil 2a).



Şekil 2. . İnsan kalbi (a) ile zebra balığı kalbinin (b) anatomileri (van Opbergen vd [51]'den değiştirilerek).

İnsanda nispeten karmaşık yapılı olan kalp, zebra balıklarında yalnızca birer atriyum ve ventrikülden oluşmaktadır. Gelişimin erken evrelerinde basit bir tüp biçimindeki kalp zamanla kıvrılarak 'S' şeklini alır. Zebra balığında kalp, toplamda dört farklı kompartımandan meydana gelmiştir. Bunlar; sinüs venozus, atriyum, ventrikül ve bulbus arteriyozustur. Oksijen bakımından fakir olan kan, kalbe basit bir kese şeklindeki sinüs venozustan giriş yaptıktan sonra atriyuma geçer. Atriyumdan ventriküle ulaşan venöz kan, buradan pompalanarak bulbus arteriyozus ile kalbi terkeder ve solungaçlarda oksijenlenmek üzere ventral aort ile taşınır [43] (Şekil 2b). Bu haliyle zebra balığının kalbi yüksek omurgalı kalbine kıyasla çok daha basit yapılıdır. Anatomik farklılıkların yanı sıra, zebra balığında pulmoner sistemin de bulunmayışına karşın, yukarıda bahsedilen kalp gelişiminde sorumlu genler (*GATA4*, *GATA6*, *MYH6* vd.) ile kalbin elektriksel aktivitesinden sorumlu ERG potasyum kanallarının korunmuş olması, bunlara ek olarak zebra balığı kardiyomiyositlerinin insan kardiyomiyositlerine kıyasla hacimce küçük olmalarına rağmen sarkomer, aktin filament yapısı ile bol miktarda mitokondriye sahip olma gibi hücreyel organizasyonlarındaki paralellikler [30,41,48], zebra balığı kalbini insan kalbinin basit bir prototipi olduğunu göstermektedir [43,52].

F. KİMYASAL AJANLAR KARDİOVASKÜLER MALFORMASYONLARA SEBEP OLUR

Kardiyovasküler hastalıklar, dünya genelinde yaygın şekilde ölümlere yol açan önemli bir sağlık problemidir. Özellikle konjenital (doğumsal) kalp hastalıkları, canlı doğumların yaklaşık %1'ini etkileyen doğumsal kusurların başında gelmekte ve bireyin yaşamını tehdit etmektedir [53]. Konjenital kalp hastalıkları, doğuştan gelen yapısal ya da işlevsel anomalileri kapsamakta ve bu anomaliler konjenital kalp defekti (anomalisi) veya kardiyovasküler malformasyon olarak nitelendirilebilmektedir [54,55].

Gelişmekte olan kardiyovasküler sistem, pestisitler de dahil olmak üzere pek çok çevresel kirletici için duyarlı bir hedeftir [56]. Kalbin gelişimi sırasında meydana gelen moleküler süreçlerdeki aksama ya da bozulmalar, ölümle sonuçlanabilen konjenital kalp hastalıklarına yol açmaktadır. Konjenital kalp hastalıklarının ortaya çıkmasında genetik ve çevresel faktörlerin birbirleriyle etkileşimlerinin etkili

olduğu düşünölmektedir [57]. Gebelik sürecinde ilaç, katkı maddesi, kozmetik ürünler veya çevresel kirleticiler gibi farklı tiplerdeki kimyasallara maruziyet, fetusun organ gelişiminde bozukluklara yol açarak doğumsal kusurlara sebep olmaktadır. Konjenital kalp hastalıklarına yol açtığı bilinen kimyasal ajanlardan bazıları retinoik asit, hidantoinler, valproat ve alkoldür [58]. Kalbin morfogenezi sırasında gerçekleşen hassas süreçleri etkileyen her türlü etken, kalp morfolojisi ve fonksiyonunda bozulmalara yol açabilmektedir. Etkili tanı ve tedavi yöntemleri ile ilaçların geliştirilebilmesi için bu hastalıklara yol açan faktörlerin ve süreçlerin net olarak ortaya konması şarttır. Bu nedenle hayvansal model sistemlere ihtiyaç duyulmakta ve kardiyovasküler hastalıkların sebeplerinin anlaşılmasında zebra balıklarından da faydalanılmaktadır.

Döllenmeyi izleyen 72. saatte zebra balıkları yutkunmaya başlayabildiğinden ilaç ve kimyasal madde uygulamaları gastrointestinal yoldan gerçekleştirilebildiği gibi, büyük boyutlu moleküller için doğrudan vitellüs kesesine, sinüs venozusa veya dolaşıma mikro-enjeksiyon şeklinde ya da doğrudan yaşam ortamına eklenerek de yapılabilmektedir. Hem canlı hem de tespit edilmiş embriyo ve larvalarda doğrudan gözlem, vital boyama, floresan işaretleyiciler veya antikorlarla inceleme yapmak mümkün olabilmektedir [59].

Zebra balığının kardiyotoksinlere karşı vermiş olduğu farmakolojik yanıtların insandakine çarpıcı biçimde benzer olduğu ortaya konmuştur [30,59-61]. Örneğin; bir trisiklik antidepresan olan Clomipramine, insanda uzamış QT aralığına yol açarken zebra balıklarında perikardiyal ödem, hemoraji, bradikardi ve yüksek konsantrasyonlarda ise ölüme neden olmuştur [62]. Sodyum kanal blokeri antiaritmik Mexiletine uygulamasının ise hem insanda hem de zebra balığında kalp atım sayısında azalmaya yol açtığı bildirilmiştir [63].

Zebra balıklarıyla yapılan çalışmalar, çevresel risk faktörlerinin tanımlanabilmesi için önem taşımaktadır. Pestisitlerin kardiyak malformasyonları indükleyici etki yapıp yapmadığını araştıran çalışmaların sayılarının artırılması gerekmektedir [56].

G. PESTİSİTLERİN ZEBRA BALIKLARINDA KALP GELİŞİMİ ANOMALİLERİNE NEDEN OLDUĞUNA DAİR RAPORLAR MEVCUTTUR

Karbamatlı pestisitlerden carbaryl uygulamasının zebra balığı embriyolarının kalp gelişimi sırasında herhangi bir morfolojik anomaliye neden olmadığı not edilirken perikardiyal ödem oluşumunu indüklediği ve bradikardiye yol açtığı rapor edilmiştir [64].

Kişisel bakım ürünlerine biyosidal aktivitesi nedeni ile eklenen triclosan maruziyetinin zebra balığı larvalarında perikardiyal ödeme sebep olduğu kaydedilmiştir [65].

Bitkisel ürünlerin patojenik mantarlardan korunmasında kullanılan difenoconazole fungusitine maruz bırakılan zebra balığı larvalarında teratojenik etkilerin yanında perikardiyal ödem ve kalp atım sayısında azalma izlendiği not edilmiştir [66].

Organofosfatlı insektisitlerden diazinon uygulamasının zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödeme ve kan hücrelerinin kalp bölgesinde birikerek göllenmesine neden olduğu bildirilmiştir [67].

Meyve, sebze ve süs bitkilerini enfekte eden pas, küf ve diğer zararlı mantarların kontrolünde kullanılan bir fungusit olan triadimefon [TF:1-(4-klorofenoksi)-3,3-dimetil-1-(1H-1,2,4 triazol-1-yl)-2

bütanon] zebra balıklarında kardiyotoksositeye neden olmuştur. Araştırmacılar, bu kimyasalın embriyolarda perikardiyal ödem, dolaşım bozuklukları, venöz tromboz, sinüs venozus ve bulbus arteriyozus arası mesafede artış gibi morfolojik kusurların yanında bradikardi ve kalp debisinde anlamlı bir azalmaya yol açtığını rapor etmişlerdir [68].

Zirai alanda herbisit, bitki büyüme düzenleyici ve meyve koruyucu ajan olarak yaygın biçimde kullanılan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) uygulamasının zebra balıklarında gelişimsel toksisiteye yol açtığı, perikardiyal ödeme neden olduğu, kalp gelişimi için belirteç genleri (*vmhc*, *amhc*, *hand2*, *vegf* ve *gata1*) yukarı regüle ettiği ve kalp atım hızında artış meydana getirdiği kaydedilmiştir [69].

Özellikle geniş yapraklı otların kontrol ajanı olarak kullanılan bir herbisit olan acetochlor, zebra balığı larvalarında kardiyovasküler toksisiteyi tetiklemiştir. Araştırmacılar, acetochlorun bradikardi, perikardiyal ödem, dolaşım defektleri ve tromboza ek olarak kalpte histopatoloji ile kalp gelişiminde rol oynayan *Nkx2.5* ve *Gata4* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin aşağı regüle olduğunu not etmişlerdir [70].

Buğday ve sebze zararlıları ile mücadele amacıyla yaygın şekilde kullanılan piretiroid insektisitlerden deltamethrin, zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem, sinüs venozus ve bulbus arteriyozus mesafesinde artış ve kalp atım sayısında azalmaya sebep olmuştur [71].

Sebze, meyve, pamuk ve pirinç zararlısı böceklerin kontrolünde kullanılan organofosfatlı dichlorvos maruziyetinin zebra balığı larvalarında kalp atım sayısını azalttığı rapor edilmiştir [72].

II. SONUÇ

Kimyasal ajanlara karşı çok hassas olan biyolojik süreçlerin sekteye uğraması ölüme varan sonuçlar doğurabilmektedir. Devamlı kullanımla çevreye sürekli olarak yayılan pestisitlerin, etkilerini hedef organizmalar dışında da gösterebildikleri bilinen bir gerçektir. Yapılan çalışmalarla gelişimin erken evrelerindeki zebra balığı kalbinin bazı pestisitler için hedef organ olduğu ortaya konmuştur. Belirgin anatomik farklılıklara karşın kalp gelişimindeki hücresel süreçlerin insanla olan benzerliği ile toksikolojik araştırmalarda sağladığı avantajlar birlikte ele alındığında, zebra balıkları kardiyak toksisite denemelerinin önemli canlı materyalleridir. İnsanla gösterdikleri büyük genetik benzerlikten yola çıkıldığında, pestisitlerin zebra balığındaki hedef bağlantı bölgelerinin de insanla benzer olduğunun ve insandaki kardiyak toksisite süreçlerinin aydınlatılmasında bu türün sağladığı faydaların altı bir kez daha çizilmelidir.

III. KAYNAKLAR

- [1] M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J. C. Mejuto, and L. García-Río, "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources," *Agriculture, Ecosystems & Environment*, vol. 123, no. 4, pp. 247-260, 2008.
- [2] D. Mozaffarian, P. W. Wilson and W. B. Kannel, "Beyond established and novel risk factors: lifestyle risk factors for cardiovascular disease," *Circulation*, vol. 117, no. 23, pp. 3031-3038, 2008.

- [3] A. Lukaszewicz-Hussain, "Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity—Short review," *Pesticide Biochemistry and Physiology*, vol. 98, no. 2, pp. 145-150, 2010.
- [4] A. Wahab, R. Hod, N. H. Ismail and N. Omar, "The effect of pesticide exposure on cardiovascular system: a systematic review," *International Journal of Community Medicine and Public Health*, vol. 3, no. 1, pp. 1-10, 2016.
- [5] D. T. Wigle, T. E. Arbuckle, M. C. Turner, A. Bérubé, Q. Yang, S. Liu and D. Krewski, "Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants," *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, vol. 11, pp. 373-517, 2008.
- [6] S. Mostafalou and M. Abdollahi, "Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives," *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2): 157-177, 2013.
- [7] S. L. Carmichael, W. Yang, E. Roberts, S. E. Kegley, A. M. Padula, P. B. English, E. J. Lammer and G. M. Shaw, "Residential agricultural pesticide exposures and risk of selected congenital heart defects among offspring in the San Joaquin Valley of California," *Environmental Research*, 135: 133-138, 2014.
- [8] N. Georgiadis, K. Tsarouhas, C. Tsitsimpikou, A. Vardavas, R. Rezaee, I. Germanakis, A. Tsatsakis, D. Stagos and D. Kouretas, "Pesticides and cardiotoxicity. Where do we stand?," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 353 pp. 1-14, 2018.
- [9] J. Greene, *Pesticide regulation handbook: a guide for users*. Boca Raton: CRC Press, 2018.
- [10] A. Biondi, V. Mommaerts, G. Smagghe, E. Vinuela, L. Zappala and N. Desneux, "The non-target impact of spinosyns on beneficial arthropods," *Pest Management Science*, vol. 68, no. 12, pp. 1523-1536, 2012.
- [11] B. Clasen, V. L. Loro, R. Cattaneo, B. Moraes, T. Lópes, L. A. de Avila, R. Zanella, G. B. Reimche and B. Baldisserotto, "Effects of the commercial formulation containing fipronil on the non-target organism *Cyprinus carpio*: Implications for rice— fish cultivation," *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 77, pp. 45-51, 2012.
- [12] S. Chatterjee, P. Basak, M. Chaklader, P. Das, J. A. Pereira, S. Chaudhuri and S. Law, "Pesticide induced alterations in marrow physiology and depletion of stem and stromal progenitor population: an experimental model to study the toxic effects of pesticide," *Environmental Toxicology*, vol.29, no.1, pp. 84-97, 2014.
- [13] S. P. Pandey and B. Mohanty, "The neonicotinoid pesticide imidacloprid and the dithiocarbamate fungicide mancozeb disrupt the pituitary—thyroid axis of a wildlife bird," *Chemosphere*, vol. 122, pp. 227-234, 2015.
- [14] W. Darwiche, S. Delanaud, S. Dupont, H. Ghamlouch, W. Ramadan, W. Joumaa, W. Bach and J. Gay- Quéheillard, "Impact of prenatal and postnatal exposure to the pesticide

- chlorpyrifos on the contraction of rat ileal muscle strips: involvement of an inducible nitric oxide synthase dependent pathway,” *Neurogastroenterology & Motility*, vol. 29, no. 2: e12918, 2017.
- [15] K. Gundogan, H. Donmez-Altuntas, Z. Hamurcu, I. H. Akbudak, M. Sungur, N. Bitgen, G. Baskol and F. Bayram, “Evaluation of chromosomal DNA damage, cytotoxicity, cytostasis, oxidative DNA damage and their relationship with endocrine hormones in patients with acute organophosphate poisoning,” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 825, pp. 1-7, 2018.
- [16] H. Nagami, Y. Nishigaki, S. Matsushima, T. Matsushita, S. Asanuma, N. Yajima, M. Usuda and M. Hirosawa, “Hospital-based survey of pesticide poisoning in Japan, 1998–2002,” *International Journal of Occupational and Environmental Health*, vol. 11, no. 2, pp. 180-184, 2005.
- [17] N. J. Osborne, R. Cairns, A. H. Dawson, K. M. Chitty and N. A. Buckley, “Epidemiology of coronial deaths from pesticide ingestion in Australia,” *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, vol. 220, no. 2, pp. 478-484, 2017.
- [18] R. N. Benjamin, T. David, R. Iyadurai and K. S. Jacob, “Suicidal nonorganophosphate poisoning in a tertiary hospital in South India: nature, prevalence, risk factors,” *Indian Journal of Psychological Medicine*, vol. 40, no. 1, pp. 47-51, 2018.
- [19] C. Roper and R. L. Tanguay, “Zebrafish as a Model for Developmental Biology and Toxicology,” William Slikker, Merle G. Paule, Cheng Wang (Eds.), *Handbook of Developmental Neurotoxicology Second Edition*, 2018, pp. 143-151, Academic Press.
- [20] K. Bambino and J. Chu, “Zebrafish in toxicology and environmental health,” *In Current Topics in Developmental Biology*, vol. 124, pp. 331-367, 2017.
- [21] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, ... S. McLaren, “The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome,” *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 498-503, 2013.
- [22] S. Scholz, S. Fischer, U. Gündel, E. Küster, T. Luckenbach and D. Voelker, “The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 15, no. 5, pp. 394-404, 2008.
- [23] S. Tran, A. Facciol, R. Gerlai, “The zebrafish, a novel model organism for screening compounds affecting acute and chronic ethanol-induced effects,” *International Review of Neurobiology*, vol. 126, pp. 467-484, 2016.
- [24] K. Y. Lee, G. H. Jang, C. H. Byun, M. Jeun, P. C. Searson, K. H. Lee, “Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: Promoting preclinical applications,” *Bioscience Reports*, vol. 37, no. 3, pp. BSR20170199, 2017.

- [25] C. A. MacRae and R. T. Peterson, "Zebrafish as tools for drug discovery," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 14, no. 10, 721-731, 2015.
- [26] D. Beis and D. Y. R Stainier, "In vivo cell biology: following the zebrafish trend," *Trends in Cell Biology*, vol. 16, no. 2, pp. 105-112, 2006.
- [27] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling, "Stages of embryonic development of the zebrafish," *Developmental dynamics*, vol. 203, no. 3, pp. 253-310, 1995.
- [28] E. Lammer, G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger and T. Braunbeck, "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 149, no. 2, pp. 196-209, 2009.
- [29] J. H. Postlethwait, Y. L. Yan, M. A. Gates, S. Horne, A. Amores, A. Brownlie, ... C. Goutel, "Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map," *Nature Genetics*, vol. 18, no. 4, pp. 345-349, 1998.
- [30] U. Langheinrich, "Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk," *Bioessays*, vol. 25, no. 9, pp. 904-912, 2003.
- [31] D. J. Milan, T. A. Peterson, J. N. Ruskin, R. T. Peterson, C. A. MacRae, "Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish," *Circulation*, vol. 107, no. 10, pp. 1355-1358, 2003.
- [32] A. Hill, N. Mesens, M. Steemans, J. J. Xu and M. D. Aleo, "Comparisons between in vitro whole cell imaging and in vivo zebrafish-based approaches for identifying potential human hepatotoxicants earlier in pharmaceutical development," *Drug Metabolism Reviews*, vol. 44, no. 1, pp. 127-140, 2012.
- [33] K. Kikuchi, J. E. Holdway, A. A. Werdich, R. M. Anderson, Y. Fang, G. F. Egnaczyk, T. Evans, C. A. MacRae, D. Y. R. Stainier and K. D. Poss, "Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4+* cardiomyocytes," *Nature*, vol. 464, no. 7288, pp. 601-605, 2010.
- [34] T. S. Wu, Y. T. Lin, Y. T. Huang, Y. C. Cheng, F. Y. Yu and B. H. Liu, "Disruption of liver development and coagulation pathway by ochratoxin A in embryonic zebrafish," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 340, pp. 1-8, 2018.
- [35] H. C. Peng, Y. H. Wang, C. C. Wen, W. H. Wang, C. C. Cheng, Y. H. Chen, "Nephrotoxicity assessments of acetaminophen during zebrafish embryogenesis," *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 151, no. 4, pp. 480-486, 2010.
- [36] J. H. He, S. Y. Guo, F. Zhu, J. J. Zhu, Y. X. Chen, C. J. Huang, J. M. Gao, Q. X. Dong, Y. X. Xuan and C. Q. Li, "A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 67, no. 1, pp. 25-32, 2013.

- [37] J. Chen, R. L. Tanguay, T. L. Tal, Z. Gai, X. Ma, C. Bai, S. C. Tilton, D. Jin, D. Yang, C. Huang and Q. Dong, "Early life perfluorooctanesulphonic acid (PFOS) exposure impairs zebrafish organogenesis," *Aquatic Toxicology*, vol. 150, pp. 124-132, 2014.
- [38] C. Thisse and L. I. Zon, "Organogenesis--heart and blood formation from the zebrafish point of view," *Science*, vol. 295, no. 5554, pp. 457-462, 2002.
- [39] B. Chaudhry, S. Ramsbottom and D. J. Henderson, "Genetics of cardiovascular development," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 124, pp. 19-41, 2014.
- [40] R. N. Wilkinson, C. Jopling, F. J. van Eeden, "Zebrafish as a model of cardiac disease," *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 124, pp. 65-91, 2014.
- [41] A. Asnani and R. T. Peterson, "The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease," *Disease Models & Mechanisms*, vol. 7, no. 7, pp. 763-767, 2014.
- [42] B. Pelster and W. W. Burggren, "Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebra fish (*Danio rerio*)," *Circulation Research*, vol. 79, no. 2, pp. 358-362, 1996.
- [43] N. Hu, D. Sedmera, H. J. Yost, E. B. Clark, "Structure and function of the developing zebrafish heart," *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, vol. 260, no. 2, pp. 148-157, 2000.
- [44] D. Y. R. Stainier, "Zebrafish genetics and vertebrate heart formation," *Nature Reviews Genetics*, vol. 2, no. 1, pp. 39-48, 2001.
- [45] M. G. Grant, V. L. Patterson, D. T. Grimes and R. D. Burdine, "Modeling syndromic congenital heart defects in zebrafish," *Current Topics in Developmental Biology*, vol. 124, pp. 1-40, 2017.
- [46] A. O. Verkerk and C. A. Remme, "Zebrafish: a novel research tool for cardiac (patho) electrophysiology and ion channel disorders," *Frontiers in Physiology*, vol. 3, pp. 255, 2012.
- [47] M. Vornanen and M. Hassinen, "Zebrafish heart as a model for human cardiac electrophysiology," *Channels*, vol. 10, no. 2, pp. 101-110, 2016.
- [48] P. Hodgson, J. Ireland and B. Grunow, "Fish, the better model in human heart research? Zebrafish heart aggregates as a 3D spontaneously cardiomyogenic in vitro model system," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 138, pp. 132-141, 2018.
- [49] B. G. Bruneau, "The developmental genetics of congenital heart disease," *Nature*, vol. 451, no. 7181, pp. 943-948, 2008.
- [50] G. E. Lyons, "Vertebrate heart development," *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 6, no. 4, pp. 454-460, 1996.

- [51] C. J. van Opbergen, S. M. van der Voorn, M. A. Vos, T. P. de Boer and T. A. van Veen, "Cardiac Ca²⁺ signalling in zebrafish: Translation of findings to man," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 138, pp. 45-58, 2018.
- [52] J. N. Chen, P. Haffter, J. Odenthal, E. Vogelsang, M. Brand, F. J. Van Eeden, M. Furutani-Seiki M. Granato, M. Hammerschmidt, Y. J. Jiang, D. A. Kane, R. N. Kalsh, M. C. Mullins and C. Nusslein-Volhard, "Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish," *Development*, vol. 123, no.1, pp. 293-302, 1996.
- [53] C. M. Rocheleau, S. J. Bertke, C. C. Lawson, P. A. Romitti, W. T. Sanderson, S. Malik, P. J. Lupo, T. A. Desrosiers, E. Bell, C. Druschel and A. Correa, "Maternal occupational pesticide exposure and risk of congenital heart defects in the National Birth Defects Prevention Study," *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, vol. 103, no. 10, pp. 823-833, 2015.
- [54] Y. Kimya, "Fetal kalp hastalıklarının prenatal tanısı," *Turkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics*, vol. 12, no. 5, pp. 399-412, 2002.
- [55] S. Ulusoy, "Siyanotik ve asiyanotik konjenital kalp hastalığı olan çocuklarda hemostatik değişiklikler," Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, 80 s, 2008.
- [56] P. G. Kopf and M. K. Walker, "Overview of developmental heart defects by dioxins, PCBs, and pesticides," *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, vol. 27, no. 4, pp. 276-285, 2009.
- [57] D. Bernstein, "Evaluation of the cardiovascular system," In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, [eds.], *Nelson Textbook of Pediatrics*, 17th ed., Philadelphia: Saunders, 2004, pp.1481-1488.
- [58] O. F. Tekbas, "Environmental Factors and Cardiovascular Diseases," *TAF Preventive Medicine Bulletin*, vol. 7, no. 5, pp. 435-444, 2008.
- [59] P. McGrath and C. Q. Li, "Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity," *Drug Discovery Today*, vol. 13, pp. 394-401, 2008.
- [60] D. Sedmera, M. Reckova, A. deAlmeida, M. Sedmerova, M. Biermann, J. Volejnik, A. Sarre, E. Raddatz, R. A. McCarthy, R. G. Gourdie, R. P. Thompson, "Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 284, no. 4, pp. H1152-H1160, 2003.
- [61] D. J. Milan, I. L. Jones, P. T. Ellinor, C. A. MacRae, "In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation," *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 291, no. 1, pp. H269-H273, 2006.
- [62] J. J. Zhu, Y. Q. Xu, J. H. He, H. P. Yu, C. J. Huang, J. M. Gao, Q. X. Dong, Y. X. Xuan and C. Q. Li, "Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce

- cardiovascular toxicity in zebrafish,” *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, no. 2, pp. 139-148, 2014.
- [63] Z. Z. Zakaria, F. M. Benslimane, G. K. Nasrallah, S. Shurbaji, N. N. Younes, F. Mraiche, S. I. Da’as and H. C. Yalcin, “Using Zebrafish for Investigating the Molecular Mechanisms of Drug-Induced Cardiotoxicity,” *BioMed Research International*, vol.4, pp.10, 2018.
- [64] C. C. Lin, M. N. Hui and S. H. Cheng, “Toxicity and cardiac effects of carbaryl in early developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 222, no. 2, pp. 159-168, 2007.
- [65] R. Oliveira, I. Domingues, C. K. Grisolia and A. M. Soares, “Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults,” *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 16, no. 6, pp. 679-688, 2009.
- [66] X. Mu, S. Pang, X. Sun, J. Gao, J. Chen, X. Chen, X. Li and C. Wang, “Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays,” *Environmental Pollution*, vol. 175, pp. 147-157, 2013.
- [67] F. L. Watson, H. Schmidt, Z. K. Turman, N. Hole, H. Garcia, J. Gregg, J. Tilghman and E. A. Fradinger, “Organophosphate pesticides induce morphological abnormalities and decrease locomotor activity and heart rate in *Danio rerio* and *Xenopus laevis*,” *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 33, no. 6, pp. 1337-1345, 2014.
- [68] H. C. Liu, T. Y. Chu, L. L. Chen, W. J. Gui, G. N. Zhu, “The cardiovascular toxicity of triadimefon in early life stage of zebrafish and potential implications to human health,” *Environmental Pollution*, vol. 231, pp. 1093-1103, 2017.
- [69] K. Li, J. Q. Wu, L. L. Jiang, L. Z. Shen, J. Y. Li, Z. H. He, P. Wei, Z. Lv and M. F. He, “Developmental toxicity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos,” *Chemosphere*, vol. 171, pp. 40-48, 2017.
- [70] H. Liu, T. Chu, L. Chen, W. Gui, G. Zhu, “*In vivo* cardiovascular toxicity induced by acetochlor in zebrafish larvae,” *Chemosphere*, vol. 181, pp. 600-608, 2017.
- [71] M. Li, X. Liu and X. Feng, “Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae,” *Chemosphere*, vol. 219, pp. 155-164, 2019.
- [72] S. Altenhofen, D. D. Nabinger, P. E. R. Bitencourt and C. D. Bonan, “Dichlorvos alters morphology and behavior in zebrafish (*Danio rerio*) larvae,” *Environmental Pollution*, vol. 245, pp. 1117-1123, 2019.