

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

N-NİTROZO-N-ETİLÜRE’NİN ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) TESTİS HİSTOLOJİSİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Meltem YILMAZ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

Haziran 2020

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.

Meltem YILMAZ

30/06/2020

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimimin ders dönemimden, tez konusunun belirlenmesinden ve tezimin sonuçlanmasına kadar geçen her aşamada hiçbir desteğini ve yardımlarını esirgemeyerek; bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana ve tezime yön veren, başta değerli danışman hocam; Sayın Prof. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ'a emeklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tez çalışmaları süresince katkı ve desteklerini hep yanımda gördüğüm, değerli hocalarım; Arş. Gör. Dr. Cansu AKBULUT ve Arş. Gör. Tarık DİNÇ'e çok teşekkür ederim.

Bu süreçte, laboratuvarında her türlü yardımlarını esirgemeyen ve dostluklarıyla hep yanımda olduklarını hissettiğim yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca üzerimdeki emekleri büyük olan, benim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve dualarını esirgemeyen başta anneme ve bu süreçte bir çınar gibi her daim arkamda duran babama ve kardeşlerime bu tezin hazırlanması sırasında gösterdikleri sabır, fedakârlık ve desteklerinden dolayı özellikle eşime şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
 BÖLÜM 1.	
GİRİŞ	1
 BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Zebra balığının sistematigi.....	3
2.1.2. Zebra balığının genel özellikleri	3
2.2. Balıklarda Gonadlar	5
2.3. Zebra Balığının Testis Yapısı ve Histolojisi.....	5
2.4. N-Nitrozo Bileşikleri	6
2.5. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesi	8
2.6. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesinin Etki Metabolizması	8
2.7. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesinin Mutajenik ve Karsinojenik Özellikleri.....	9
 BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal	11

3.1.1. Zebra balığı	11
3.1.2. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre).....	11
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. Deney düzeneği.....	12
3.2.2. Histolojik analizler	13
3.2.2.1. Fiksasyon.....	13
3.2.2.2. Dehidrasyon.....	14
3.2.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme	14
3.2.2.4. Kesit Alma.....	14
3.2.2.5. Boyama.....	15
 BÖLÜM 4.	
ARAŞTIRMA BULGULARI	16
4.1. Kontrol Grubu.....	16
4.2. ENU Maddesi ile Bir Saat Maruz Kalan Dozlar.....	17
4.2.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup	17
4.2.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup	19
4.3. ENU Maddesi İki Saat Maruz Kalan Dozlar	21
4.3.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup	21
4.3.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup	24
 BÖLÜM 5.	
TARTIŞMA VE SONUÇ	26
KAYNAKLAR.....	32
ÖZGEÇMİŞ	36

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
β	: Beta
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
ENU	: N-Nitrozo-N-Etilüre
g	: Gram
kg	: Kilogram
L	: Leydig hücreleri
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
Ppm	: Milyonda bir
PS	: Primer spermatosit
S	: Sperm
SG	: Spermatogonyum
SK	: Sekonder spermatosit
sn	: Saniye
ST	: Spermatit

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Seminifer tübül içindeki hücrelerin genel görünümü.	6
Şekil 2.2. ENU maddesinin açık formülü (Sigma-Aldrich, 2019).....	8
Şekil 3.1. Deney düzeneği.....	13
Şekil 4.1. Kontrol Grubunda Testis Dokusu Genel Yapısı.	17
Şekil 4.2. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu.....	18
Şekil 4.3. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu.....	18
Şekil 4.4. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu.....	19
Şekil 4.5. 0,50 mM ENU'ya bir saatlik maruz kalan zebra balığı testis dokusu.	20
Şekil 4.6. 0,50 mM ENU'ya bir saatlik maruz kalan zebra balığı testis dokusu. .	20
Şekil 4.7. 0,25 mM ENU'ya iki saatlik maruz kalan zebra balığı testis dokusu...	22
Şekil 4.8. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu.....	22
Şekil 4.9. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu.....	23
Şekil 4.10. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu....	23
Şekil 4.11. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu....	24
Şekil 4.12. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu....	25
Şekil 4.13. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu....	25

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Bouin solüsyonunun hazırlanışı.....	13
Tablo 3.2. Dehidrasyon, saflaştırma ve parafine gömme takip serileri	14
Tablo 3.3. Hemotoksilen & Eozin boyama yöntemi.....	15



ÖZET

Anahtar kelimeler: Zebra balığı, N-Nitrozo-N-Etilüre (ENU), testis, histopatoloji

N-Nitrozo bileşikler, 20. yüzyılın başından itibaren bilinen, ancak 1950'lerden sonra canlı sağlığı üzerine etkileri daha çok dikkat çeken bileşiklerdir. N-Nitrozo-N-Etilüre (ENU) günümüzde gıda ürünlerini koruyucu olarak kullanılan önemli bir maddedir. Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda toksik, teratojenik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada N-Nitrozo-N-Etilüre'nin zebra balığı testis dokusundaki histopatolojik etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışma kontrol ve deney grupları olmak üzere toplam 5 gruba ayrılmış, deney grupları 0,25 mM, 0,50 mM dozlarda ENU'ya maruz bırakılmıştır. Alınan doku örnekleri Hemotoksilen&Eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenmiştir. Doz ve maruziyet süresinin artışına bağlı olarak deney gruplarının testis dokusunda, seminifer tübüllerde dejenerasyon, seminifer tübüllerde vakuolizasyon, seminifer tübüllerde açılma, seminifer tübül bütünlüğünün bozulması, spermatogenetik seride yer alan hücre kümelerinde sınırlarının ve dağılımlarının bozulması, seminifer tübüller alanda kanlanma, spermatogenetik hücre sayılarında azalmalar, spermatogenik hücre gruplarında vakuolizasyon, bazı hücrelerde hipertrofi ve bazı spermatogonyum hücrelerinde apoptoz görülmüştür. Ayrıca seminifer tübül çevresindeki bağ dokuda kalınlaşma, doz grubuna bağlı olarak sperm sayısında artış ve yer yer piknotik hücrelerde tespit edilmiştir. Bulgular ENU'ya maruz kalan erkek zebra balıklarının testis dokularında olumsuz değişimler meydana getirdiğini ortaya koymuştur.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF N-NITROZO-N-ETHYLUREA ON ZEBRA FISH (*Danio rerio*) TESTICULAR HISTOLOGY

SUMMARY

Keywords: Zebrafish, N-Nitrozo-N-Ethylurea (ENU), testis, histopathology

N-Nitrozo compounds have been known since the beginning of the 20th century, but are more remarkable since the 1950s. N-Nitrozo-N-Ethylurea (ENU) is an important substance used today as a preservative in food products. As a result of research on experimental animals, toxic, teratogenic, mutagenic and carcinogenic effects have been reported. The aim of this study was to investigate the histopathological effects of N-Nitrozo-N-Ethylurea on the testicular tissue of zebrafish. This study was divided into 5 groups as control and experimental groups and the experimental groups were exposed to ENU doses of 0.25 mM, 0.50mM Tissue samples were stained with Hemotoxylin&Eosin and examined under light microscope. Depending on the increase in dose and exposure time, degeneration in testicular tissue of the experimental groups, seminiferous tubules, vacuolization in seminiferous tubules, opening in seminiferous tubules, deterioration of seminiferous tubule integrity, bleeding in the cell clusters in the spermatogenetic series, disruption in the number of cells and distribution in the seminiferous tubules area, decreases in the number of spermatogenetic cells. vacuolization in spermatogenic cell groups, hypertrophy in some cells and apoptosis in some spermatogonium cells. In addition, thickening of the connective tissue around the seminiferous tubule, an increase in the number of sperms depending on the dose group, and in some places, were detected in piconotic cells. The findings revealed that male zebra fish exposed to ENU caused negative changes in the testicular tissues.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Her geçen gün artan insan nüfusu ve buna bağlı olarak endüstrinin hızlı gelişimi sebebiyle, endüstriyel kaynaklı kirleticiler doğaya karışmakta (Şişman ve Geyikoğlu, 2010) ve kirlilik sucul ekosisteme ulaşmaktadır (Glaser, 2006).

Sucul ekosistemlerde ise bu kirliliğe en çok balıklar maruz kalmaktadır (Dutta ve Dalal, 2008). Endüstriyel atık bölgelerinde, kimyasal depo alanlarında toksik maddeler meydana gelebilir. Balıklar, bu toksik maddelerin yer altı ve yer üstü sularda meydana getirdiği etkileri, kirlenmeleri tespit edilmesinde ve izlenmesinde kullanıma en uygun olan küçük omurgalı canlılardır (Nagel, 2002).

Zebra balığı insanlarla, beyin, kalp, damar, sindirim, kas sistemi ve doğuştan gelen bağışıklık sistemi de olmak üzere genetik ve fizyolojik bir benzerlik göstermektedir. Zebra balıkları küçük canlılardır ve beslenmeleri için yüksek maliyet gerekmez. Bu sebeplerle laboratuvar ortamında zebra balığı larvalarının korunması ve beslenmesi uygun harcamalar ile kolaydır (Bakkers, 2011; Liu ve Stainier, 2012).

Zebra balığı; genetik, fizyolojik, gelişimsel benzerliklerinin yüksek olması ve en önemlisi insanlarda bulunan tümör baskılayıcı gene sahip olması (Şişman ve Geyikoğlu, 2010) sebebiyle insan hastalıklarının gelişimini ve modellemesini araştırmak için giderek daha fazla tercih edilen bir model olmuştur. Aynı zamanda beyinsel sinir bozuklukları, depresyon, psikozlar, otizm ve kas distrofileri gibi kas hastalıklarının tedavisi için de çalışılmıştır. Bununla birlikte zebra balığının, yüzgeçlerini ve kalp dokusunu yenileme özelliğinden yararlanılarak, çeşitli yaralanmalara karşı yaraların yenilenip iyileşmesine nasıl yanıt verdiğinin anlaşılması için kullanabilecek bir model olduğu da ortaya konmuştur (Zhao ve ark., 2015).

Zebra balığının, bütünleştirici fizyoloji, ekotoksikoloji veya su ürünleri yetiştiriciliği gibi uygulamalı araştırma alanlarında da kullanımını artarak devam etmektedir (Leal ve ark., 2009). Bu özellikleri göz önüne alındığında son yıllarda yapılan çalışmalarda, zebra balığı insan hastalıkları için gelişme ve organogenezi de içine almakla birlikte, biyolojik sorunların araştırılıp incelenmesi için önemli bir canlı sistem olarak yerini almıştır (Beckwith ve ark., 2000).

N-Nitrozo-N-Etilüre'nin (ENU) doğada kendiliğinden oluştuğu bilinmemektedir. N-Etilüre, nitroz asit tepkimesiyle ile sentezlenmiştir (Knapik, 2000). ENU (N- Nitrozo-N-Etilüre) birçok canlı türünde kanserojen olan ve böylece DNA'ya hasar vererek hücre ölümüne yol açan bir kimyasal ajandır. Tümörlerin sinir dokusu, mide, özofagus, pankreas, solunum yolu, bağırsak, deri ve böbrekte olmak üzere birçok doku üzerinde oluşumunda bu DNA alkileyici ajanın etkisi büyüktür (Slikker ve ark., 2004; Zhao ve ark., 2015).

Çevreye yayılma sebebinin endüstriyel faaliyetler ve doğal süreçlerin olduğu N-Nitrozo bileşiklerine, yapısında nitrit bulunan ya da nitrojen oksite maruz kalmış gıda maddelerinde rastlanılmıştır (Beckwith ve ark., 2000).

Ekotoksikolojinin alt disiplinlerinden biri de üreme toksikolojisidir (Arukwe, 2001). Endokrin sistem üreme fonksiyonlarını kontrol etmektedir. Halk ve çevre sağlığı açısından önemli olan endokrin sistemini çevremizdeki bazı kimyasalları taklit ederek endojen hormonlara benzer etki veya inhibesi sonucu bu hassas dengeyi bozabilirler. Aynı şekilde balıklarda bazı östrojenik kimyasallar, spermatogenezi bozar ve spermatozoanın üretimini azaltır (Beckwith ve ark., 2000). Canlılar toksik maddelerin etkisi altında kaldıklarında, hücreler genellikle hücresel şişme, dejenerasyon veya nekroz gibi anomaliler gösterir (Li ve ark., 2017).

Bu çalışmanın amacı çeşitli konsantrasyonlarla ENU maddesi uygulanan zebra balıklarının (*Danio rerio*) testis dokularında histopatolojik değişiklik olup olmadığını araştırmaktır.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zebra Balığının Genel Özellikleri

2.1.1. Zebra balığının sistematığı

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclassis: Pisces

Classis: Osteichthyes

Subclasis: Actinopterygii

Superordo: Teleostei

Ordo: Cypriniformes

Familiya: Cyprinidae

Genus: Danio

Species: *Danio rerio* (Hamilton, 1822)

2.1.2. Zebra balığının genel özellikleri

Zebra balığı, bazı akarsularda (Kuzey Hindistan, Güney Asya, Bhutan, Pakistan ve Nepal gibi ülkelerde) yaşamını devam ettiren tropikal bir balıktır (Kutluyer ve Aksakal, 2013). Actinopterygii sınıfının Cyprinidae familyasından kemikli balık (Teleostei) türlerindendir (Carpio ve Estrada, 2006). Zebrada bulunan çizgilere benzer oldukları için zebra balığı adını almıştır. Başka balıklarla beraber ve uyumlu yaşarlar. 20 ile 30-32°C arasındaki sıcaklıklarda yaşamlarını sürdürebilirler. Optimal su ısı 25-26°C'dir. pH 6,5 ile 7,2 arasındaki sular bu balıklar için uygundur. Her türlü balık yemini yiyebilirler (Alpbaz, 1993).

Genç zebra balıklarının boyları 4,5-5 cm uzunluğundadır. Erkek bireyler dişi bireylerden farklı olarak, daha büyük anal yüzgeçlere ve genital papillaya sahiptir. Zebra balıklarında ovipar (yumurta vererek) üreme görülür. Erkek zebra balıkları 74-75 günlük iken üreme davranışı sergileyebilmektedir. Dişi zebra balığı üreme zamanında 150-400 arasında yumurta üretebilmektedir. Yaşamı boyunca da yaklaşık 1500-1800 arasında yumurta verebilmektedir (Ekici, 2007). Uygun laboratuvar koşulları olduğu sürece yıl boyunca yumurta üretebilir (Brand ve ark., 2002).

Zebra balığının üretimi kolaydır ve hızlı bir gelişim gösterir. Hücre transplantasyonu, mikroenjeksiyon gibi deneylere karşı dirençli olup, 24 saatte embriyogenez oluşumu gerçekleşir. Organları 5 gün içinde gelişimini tamamlar. Bu özellikleri nedeniyle, bilimsel araştırmalarda kullanılması ve embriyoda meydana gelen etkilerinin incelenmesi kolaydır (Gilmour ve ark., 2002). Ayrıca, şeffaf yapılı koryon ve embriyoya sahip olan zebra balıkları, ilk larval evrelerinden itibaren organlarının oluşumuna denk izlenip takip edilmesi için büyük avantaj sunar. Zebra balığı, genetik çalışmalarda da önemli yere sahiptir. Yeni genlerin tanımlanmasında ve bu genlerin fonksiyonlarının keşfedilmesi, zebra balıklarının insan hastalıkları için uygun bir canlı olmasına neden olmuştur (Pelegri, 2002). Mutasyonlar, zebra balığı sperm örneklerinde korunabilir ve *in vitro* dölleme de kullanılabilir (Kutluyar ve Aksakal, 2013).

Zebra balıkları farmakolojik çalışmalarda da çok sık kullanılmaktadır (Ma ve ark., 2003). Bunların yanı sıra zebra balıkları 4 ya da 5 yıl yaşayabildikleri için bazı kanser biyologları tarafından kanserin ne zaman ve nasıl geliştiğini incelemek için uygun bir organizma olmuştur (Beckman, 2007).

Zebra balıklarının yaşam döngülerinin diğer bir model organizma türü olan farelerin yaşam döngülerinden daha kısa olması, farelerle yapılan deneylerin, bu balık türüyle de yapılabilmesi ayrıca farelere göre neslin daha kolay takip edilebilmesi (özellikle teratojenik testlerde) bu tür ile çalışmak için ayrı bir avantaj sağlamıştır. Ayrıca farelerde embriyonun anne vücudu içinde gelişme aşamaları zigot oluşumundan itibaren izlenememektedir. Zebra balığında ise embriyolar anne vücudu dışında

geliştiğinden dolayı, döllenmeden itibaren embriyon gelişiminin her aşaması izlenebilmektedir. Zebra balığının, toksikoloji çalışmalarında kullanılmasının bir diğer sebebi ise uygulanan testlerin kısa oluşu ve sonuçların hassas olmasıdır (Kanev, 2016).

2.2. Balıklarda Gonadlar

Gonad olarak isimlendirilen üreme organları, dişilerde ovaryum, erkeklerde ise testis adını alırlar. Ovaryumlar (dişi üreme organları) genellikle bir çifttir. Büyüklük ve ağırlıkları değişmekle beraber, olgunlaştıkları zaman balık ağırlığının %25'i kadar olabilirler. Üreme mevsiminde yetişkin balık ovaryumları açık sarı veya kahverengimsi bir renk olarak ve taneli şeklinde olup bol miktarda kılcak kan damarları içerir. (Alpbaz, 1990)

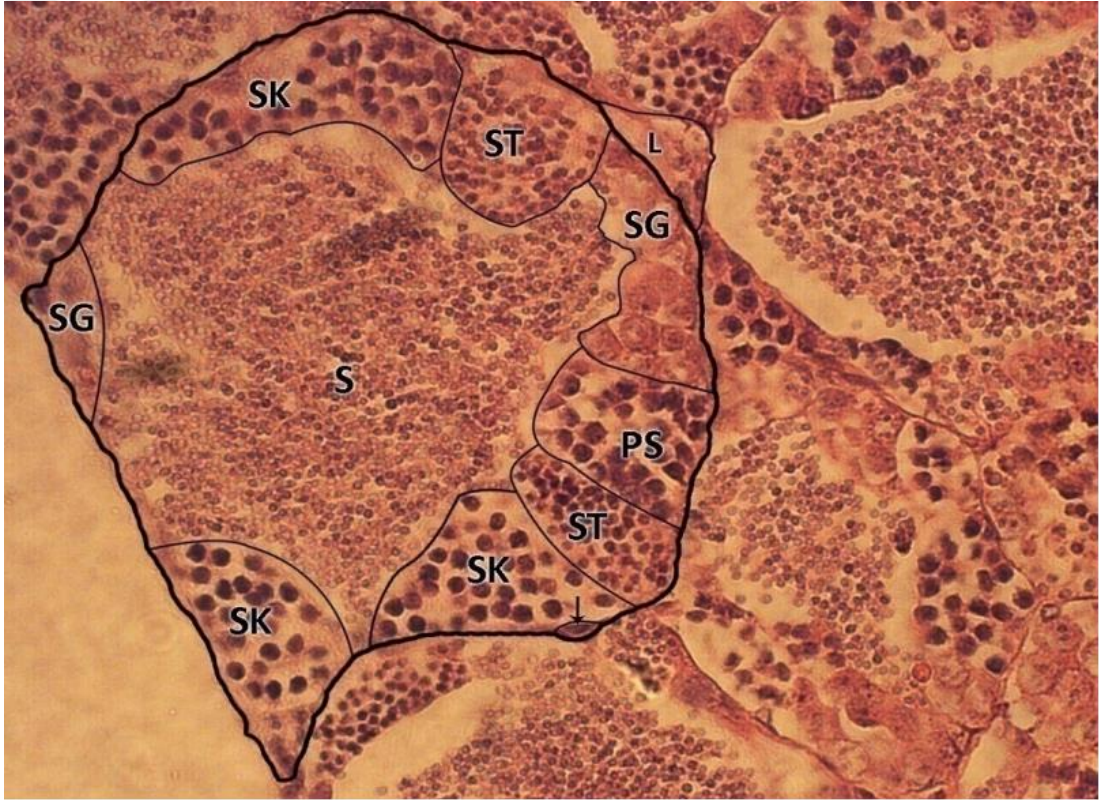
Erkek üreme organları ise testisler olup, genellikle tatlı su balıklarında çifttir. Üreme mevsimine bağlı olarak büyüklükleri değişir. Ergin haldeki bir balıkta, üreme zamanında testislerin rengi beyazımsı, düz bir görünüştedir ve üzerinde kılcak kan damarları görülmez. (Alpbaz, 1990)

2.3. Zebra Balığının Testis Yapısı ve Histolojisi

Testis erkek üreme hücrelerinin bulunduğu bir dokudur. Seminifer tübüller ve etrafını saran bağ dokudan meydana gelmiştir. Seminifer tübüllerde spermatogenez meydana gelmektedir. Spermatogenez, mayoz ve spermiyogenez geçiren hücrelerin bütün evrelerini kapsar. Spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve sperm hücreleri spermatogenezde yer alan hücrelerdir. Seminifer tübüller arası ve bağ doku birleşiminde Leydig hücreleri, lümen içerisinde ise spermatogenik hücreler bulunmaktadır (Koç ve ark., 2012). Sertoli hücreleri ise spermatogenik hücreleri saran ve hücreler arası boşlukları dolduran destek hücreleridir (Şeftalioğlu, 1998).

Spermatogonyum hücreleri büyük çekirdekli, renksiz sitoplazmaya sahip, homojen yapıdaki hücrelerdir. Belirsiz yapıda çekirdeklere sahip olan spermatogonyum A, daha

koyu ve belirgin yapıda olanlar spermatogonyum B ismini alır. Spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalırlar. Mayoz I'in profaz evresinde bu hücelere spermatosit hücreleri denilmektedir. Spermatogoyum hücrelerinden çoğalan spermatositler, spermatogonyum hücrelerine göre daha küçük ve yoğun sitoplazmaya sahiptirler. Primer spermatosit hücreleri oval yapıda ve sitoplazması yoğun olan hücrelerdir. Primer spermatosit hücreleri, mayoz I bölünmesinden sonra sekonder spermatosit hücrelerini oluştururlar. Sekonder spermatosit hücreleri, primer spermatosit hücrelerine benzer. Fakat daha küçük ve yuvarlak yapıdadırlar. Spermiyogenezin son aşamasında spermatitlerin küçülüp kuyruk benzeri yapılaraya sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.1.) (Koç ve ark., 2012).



Şekil 2.1. Seminifer tübül içindeki hücrelerin genel görünümü. SG; Spermatogonium hücreleri, PS; Primer spermatosit, SK; Sekonder spermatosit hücreleri, ST; Spermatit hücreleri, S; Sperm hücreleri, L; Leyding hücreleri, H&E Boyama, x40 (Koç ve ark. 2012).

2.4. N-Nitrozo Bileşikleri

N-Nitrozo bileşikleri, kimya literatüründe 20. yüzyılın başından itibaren bilinen, ancak 1956 yılından sonra insan sağlığı üzerine etkileri daha çok dikkat çeken ve araştırılan

bileşiklerdir. Deney hayvanları üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda toksik, teratojenik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu belirtilmiştir. N-Nitrozo bileşiklerinin oluşumunda nitrit ve nitrojen oksitlerin sekonder ve tersiyer aminlerle tepkimeye girmesinin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Çakmak ve ark., 2009).

Karsinojenik olduğu bilinen N-Nitrozo bileşiklerinin ana maddesi nitrittir. İnsanların ve diğer canlıların yiyeceklerindeki fazla nitrit miktarı, sağlık açısından tehlikeli olduğu gibi N-Nitrozo bileşiklerinin oluşmasına sebep olduğu için de önemlidir (Oruç, 2001). Nitritler asitli bir ortamda önce nitroz aside dönüşür. Sekonder yapıli aminler ile N-substituyentli amidler, nitroz asitle reaksiyona girerek N-Nitrozo bileşiklerini meydana getirirler. Bu bileşikler canlıların mide, özofagus, bağırsak karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi ve lenfoid sistem gibi organ ve sistemlerinde kanser oluşumuna sebep olurlar (Ekici ve ark., 2008).

Gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan nitrit, *Clostridium botulinum* başta olmak üzere birçok mikroskobik canlıların oluşumunu engellemek ve oksidatif acılaşmayı önlemek için kullanılmaktadır. Ayrıca nitrit, et ürünlerinde karakteristik kürlenmiş et renginin, lezzet ve doku özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Turp ve Sucu, 2016).

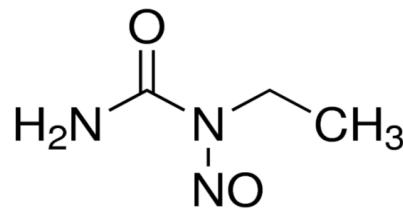
Nitrit nitrata göre 10 kat daha toksik bir bileşik olmakla birlikte insanlar için nitratin letal dozu 80-800 mg/kg, nitrit için letal dozu 33-250 mg/kg olarak belirlenmiştir (Serdaroglu ve Ergezer, 2015). İnsanlardaki günlük nitrat miktarının % 6'sını tüketilen kürlenmiş etler oluşturur. Geri kalan % 94'lük kısmı ise sebzeler, su, tükürük ve mide öz suyu salgısıyla vücutta bulunur (Çakmak ve ark., 2009). Nitrat direk olarak toksik etkiye sahip değildir. Nitrat, bakteriyel nitrat redüktaz reaksiyonu ile yararlı olmayan nitrit iyonlarına dönüşür. Vücuttaki nitratin birçoğu dışkı yolu ile atılırken kalan kısmı da ağızdaki bakteriler tarafından nitrite indirgenir ve oluşan nitrit, nitrozolama ajanını meydana getirmiş olur. Birçok gıda maddesinde amin bulunmakta ve nitrozolama ajanı ile asitli bir ortam olan midede nitrozaminler oluşabilmektedir (Çakmak ve ark., 2009).

Et ürünlerine eklenen nitrit miktarı, etin kalitesi, etin yağ içeriği, diğer bileşenleri, kurutma ve dumanlama süresince müdahale edilen ısı işlem, olgunlaştırma zamanı, depolama koşulları ve ambalajlama gibi faktörler (Turp ve Sucu, 2016), gıdanın pişirilme şekli, maruz kalınan ısı ve süresi de Nitrozo amin oluşumunda etkilidir (Çakmak ve ark., 2009).

İnsanlar, N-Nitrozo bileşiklerine çeşitli şekillerde maruz kalabilmektedir (Solnica-Krezel ve ark., 1994). Nüfus ve sanayileşmenin son yıllarda artması ile nitrit ve nitratın sularda bulunma ihtimali ve oranında artma tespit edilmiştir. 20 mg'dan çok nitrat içeren suların, yetişkinler tarafından uzun zaman tüketiminde akut ve kronik zehirlenmelere sebep olduğu bilinmektedir (Serdaroglu ve Ergezer, 2015).

2.5. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesi

N-Etilüre ilk olarak 1919'da nitroz asit reaksiyonu ile sentezlenmiştir. Arı olarak, pembe-sarı kristaller neme ve ışığa karşı hassastır (Knapik, 2000). ENU'nun kararlılığı pH'a bağlıdır; ENU'nun yarı ömrü, pH 7,0, sıcaklık 37 °C, 34 dk, bir miktar daha düşük sıcaklıkta ve pH 6,0'da ise, yarı ömür 30 saatin üzerine çıkar (IARC, 1972). Ampirik formül: $C_3H_7N_3O_2$ 'dir. Molekül ağırlığı 117,11, saklama derecesi ise -20 °C'dir. İçerik 100 ml çözücü içerisinde çözündürülerek % 1'lik bir çözelti elde edilir (Sigma-Aldrich, 2019).



Şekil 2.2. ENU maddesinin açık formülü (Sigma-Aldrich, 2019).

2.6. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesinin Etki Metabolizması

ENU, rastgele tek baz çiftli mutasyonlara neden olan, aktivasyonu için gerekli herhangi bir metabolik işlem gerektirmeden doğrudan nükleik asitler üzerinde etkili

olan bir bileşiktir (Singer ve Dosanjh, 1990; Noveroske ve ark., 2000). ENU, etil grubunu oksijene veya azot köklerine aktarabilen, yanlış eşleştirme ve baz eklenmesi ile sonuçlanan DNA alkileyici maddedir (Justice ve ark., 1999). Belirlenen sayısız potansiyel alkilasyon reaksiyon yerleri (nükleofilik alanlar) vardır. ENU çoğunlukla nokta mutasyonlarını indükler, ancak birkaç küçük silme (delesyon) veya ekleme (insersiyon) bildirilmiştir (Kennedy ve O'Bryan, 2006).

2.7. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre) Maddesinin Toksik Özellikleri

Son yıllarda, insan hastalıklarında rol alan yeni genleri tanımlamak için ENU mutajenizini kullanmıştır. ENU, oluşturduğu nokta mutasyonlarının indüksiyonunun yüksek oranda olması nedeniyle fenotip odaklı çalışmalar için ideal bir mutajendir ve potansiyel olarak hastalık fenotiplerinin geniş bir yelpaze açar (Balling, 2001). ENU çoğunlukla nokta mutasyonlarına neden olduğu için, bir gen üzerindeki etkisi birçok farklı allel türü üretmektir. Her biri, protein ürünü üzerinde farklı bir etkiye sahip olabilir. Belirli bir genin allelik serilerinin üretilmesi, bir protein içindeki kritik alanların ve kalıntıların tanımlanmasını sağlayabilir (Kennedy ve O'Bryan, 2006). İnsan genetik lezyonlarının inceliklerini ve heterojenliğini taklit edebilmektedir (Oliver ve Davies, 2012). Farelerde, sıçanlarda ve zebra balıklarında yapılan deneysel çalışmalarda nörokarsinojen olarak rol oynadığı da gösterilmiştir (Druckrey ve ark., 1973; Rice ve Ward, 1982). Ayrıca ENU, farelerde de en etkili kimyasal mutajen olarak kabul edilir, yaygın olarak kullanılan dozlarda, gametlerde lokus başına 0.0015'lik bir mutasyon oranı vardır (Rinchik, 1991). Çok yüksek miktarlarda enjekte edilirse, farelerin erken ölümüne neden olabilir. Toksisite belirtileri ise 1 hafta içerisinde uyuşukluk, kilo kaybı ve ölümdür (Justice ve ark., 2000).

ENU ile maruz bırakılan spermelerin, dölleme yetenekleri etkilenebilir (Goda ve ark., 2006). ENU, spermatogenik hücrelerin tüm aşamalarına mutajenik veya sitotoksik olduğundan, hücre bölünmesi ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Solnica-Krezel ve ark., 1994; Hardisty ve ark., 1999).

ENU kullanımı sonrası hayatta kalmayı etkileyen kilit parametreler şunlardır: ENU konsantrasyonu, maruz kalma süresi, maruz kalma sayısı, pH ve maruz sırasında suyun sıcaklığıdır. Özellikle ENU konsantrasyonu ve maruz kalma süresi sağ kalım açısından çok sıkı bağlantılıdır. Ayrıca sıcaklık hayatta kalma ve doğurganlık üzerine de etkilidir (Knapik, 2000).

Mutajen ve kanserojen bir madde olan ENU'ya denekler farklı duyarlılıklar gösterebileceğinden, toksik olmayan ENU konsantrasyonlarını belirlemek önemlidir (Justice, 2000). Zebra balığı ile yapılan bir araştırma da çeşitli dozlar (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 5 mM) kullanılarak yapılan deneyde, 4mM uygulanan grupta ki balıkların yarısı öldüğünden letal doz 4mM olarak tespit edilmiştir (Solnica-Krezel ve ark., 1994).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Zebra balığı

Cyprinadae familyasının bir üyesi olan zebra balığının üzerinde zebra çizgilerine benzer hatlar vardır. Diğer balıklarla ile uyumlu yaşarlar. Dişilerde karın oldukça şişkin ve tombuldur (Hisaoaka ve Battle, 1958). Erkek zebra balıklarının karınları dişilere oranla daha düz ve ince görünümündedir. Ayrıca erginleşmiş erkeklerin dişiye kıyasla anal yüzgeçleri büyük ve dişilerde genital papillalar daha belirgindir. Vücut genel olarak gümüş rengindedir.

Tez çalışması kapsamında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Balık Yetiştirme Laboratuvarı'ndan temin edilen toplam 30 adet erkek zebra balığı kullanıldı. Balıklar 48 saat dinlendirilmiş musluk suyunda 14:10 saat aydınlık:karanlık foto periyodunda, 28 °C sıcaklıkta, günde 2 defa TetraPro Energy® yem ile beslendi. Akvaryumlar sürekli olarak filtreli bir hava pompasıyla havalandırıldı ve temizlendi. Balıkların her türlü bakım, temizlik ve besleme işlemleri düzenli şekilde yapıldı.

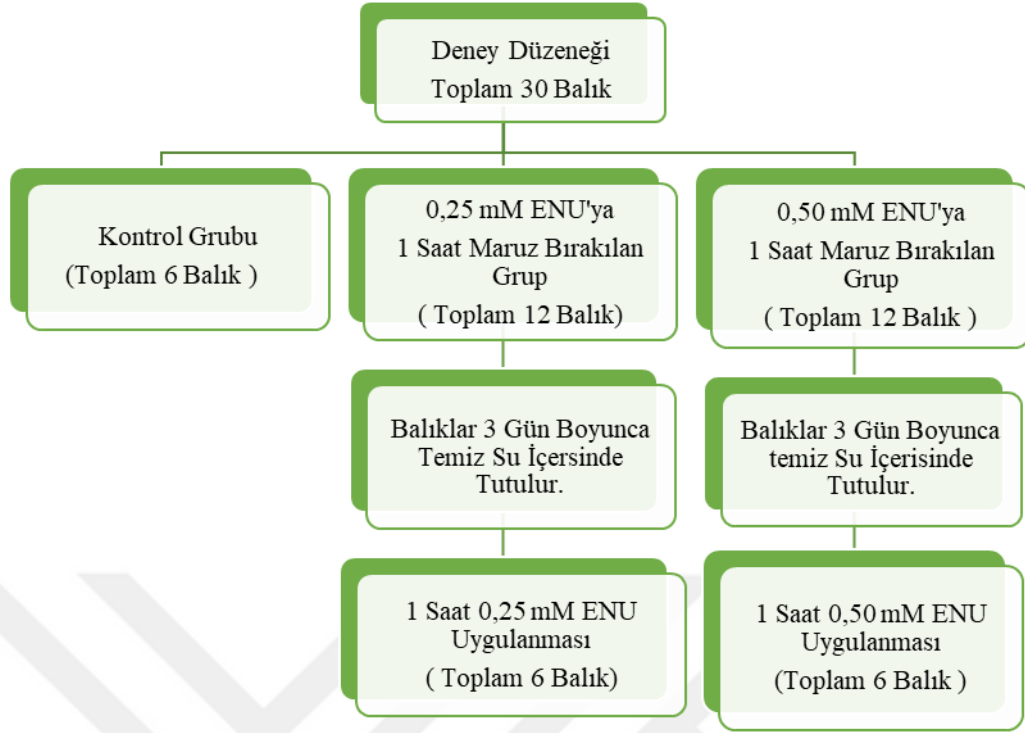
3.1.2. ENU (N-Nitrozo-N-Etilüre)

Zebra balıklarında deneysel etken olarak ENU Sigma-Aldrich marka ENU (N3385-CAS number: 759-73-9) maddesi kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney düzeneği

Tez çalışması için Sakarya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarı içerisinde bir akvaryum düzeneği kuruldu. 10x20x35 cm boyutlarında 5 adet akvaryum temin edildi. Akvaryumlardaki suyun sıcaklığı $25\pm1^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde sabitlendi ve sürekli hava motorları ile oksijenlendirildi. Deney kapsamında 1 kontrol ve 4 deney grubu olmak üzere toplam 5 grup oluşturuldu. Her grupta 6'şar erkek zebra balığı olmak üzere toplamda 30 erkek zebra balığı kullanıldı. Kontrol grubu ve deney gruplarında, balıklar toplamda sıvı hacmi 4 litre olan akvaryumlara yerleştirildi. İki grup 0,25 mM'lik ENU maddesine bir saat maruz bırakıldı daha sonra içerisinde temiz su bulunan akvaryumlara alındı. Diğer iki grupta 0,50 mM'lik ENU maddesine bir saat maruz bırakıldı ve sonrasında temiz su bulunan akvaryuma alındı. Tüm deney grupları üç gün, içerisinde temiz su bulunan akvaryumlarda dinlendirildi. ENU maddesine bir saat maruz bırakılan 0,25 mM'lik iki gruptan biri alınarak tekrar bir saat 0,25 mM'lik ENU maddesine maruz bırakıldı. Böylece 0,25 mM'lik bir doz grubu ENU maddesine bir saat maruz kalırken diğer grubu da toplamda iki saat ENU maddesine maruz bırakıldı. Aynı şekilde 0,50 mM olan doz grubun da bu yol uygulandı. Tüm balıklar histolojik analiz için beşinci gün sonunda anestezi uygulaması ardından diseksiyon işlemine alındı (Şekil 3.1.). Deney düzeneği, yapılan literatür araştırmaları doğrultusunda ve çalışmanın güvenilirliği için biri ön deneme olmakla birlikte 3 kez tekrarlanarak toplamda 90 balık kullanıldı. Disekte edilen testis dokuları rutin histolojik işlemlere tabi tutuldu. Yapılan ön deneme, doz miktarının uygunluğunun belirlenmesi ve maddenin histopatolojik rutin etkisinin görülmesi önemli olduğu için yapıldı.



Şekil 3.1. Deney düzeneği

3.2.2. Histolojik analizler

3.2.2.1. Fiksasyon

Bu çalışmada fiksatif olarak Bouin solüsyonu kullanılmıştır. Alınan testis dokuları Bouin fiksatifinde 24 saat boyunca fikse edilmiştir (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Bouin solüsyonunun hazırlanışı

Solüsyonun Adı	Solüsyonun İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı	Uygulama Süresi
Bouin	Distile suda doyurulmuş pikrik asit	75 ml	24 saat
	%40 Formaldehit	25 ml	
	Glasiyal Asetik Asit	5 ml	

3.2.2.2. Dehidrasyon

24 saatlik tespit işlemini takiben, dokulardaki fazla suyun uzaklaştırılması için testis dokuları artan derecelerde (%70, %80, %90, %95, %100) etanol serilerinden (Tablo 3.2.) geçirildi.

3.2.2.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Testis dokuları artan alkol serilerinin ardından 24 saat ksilolde bekletildi (Tablo 3.2.) Amaç dokularda bulunan alkol ile ksilolün yer değiştirmesidir. Dokular sıvı parafin içine konulup 60°C’de etüvde bir gece bekletildi ve ardından testis dokuları sıvı parafin içerisinde bloklara gömüldü.

Tablo 3.2. Dehidrasyon, saflaştırma ve parafine gömme takip serileri

Solüsyon Adı	Solüsyonun İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı (mL)	Uygulama Süresi (gün)
%70 ALKOL	Etanol Distile Su	70 30	1
%80 ALKOL	Etanol Distile Su	80 20	1
%90 ALKOL	Etanol Distile Su	90 10	1
%95 ALKOL	Etanol Distile Su	95 5	1
%100 ALKOL	Etanol	100	1
%100 ALKOL	Etanol	100	1
KSİLOL		100	1
SIVI PARAFİN		60°C’de 1 Gece	

3.2.2.4. Kesit Alma

Parafin bloklardan Leica marka döner mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosuna konularak albumin mayer sürülmüş lamlara alındı.

3.2.2.5. Boyama

Testis dokuları histopatolojik açıdan değerlendirilmek üzere, Hemotoksilen&Eozin (H-E) boyama yöntemi ile boyandı (Tablo 3.3.). Hemotoksilen, hazır solüsyon olarak Sigma-Aldrich marka (H3136-CAS number: 517-28-2) kullanıldı. Eozin, hazır solüsyon olarak Sigma-Aldrich marka (230251-CAS number: 15086-94-9) kullanıldı. Boyanan preparatlar Leica DM500 marka ışık mikroskobu ile incelendi.

Tablo 3.3. Hemotoksilen & Eozin boyama yöntemi

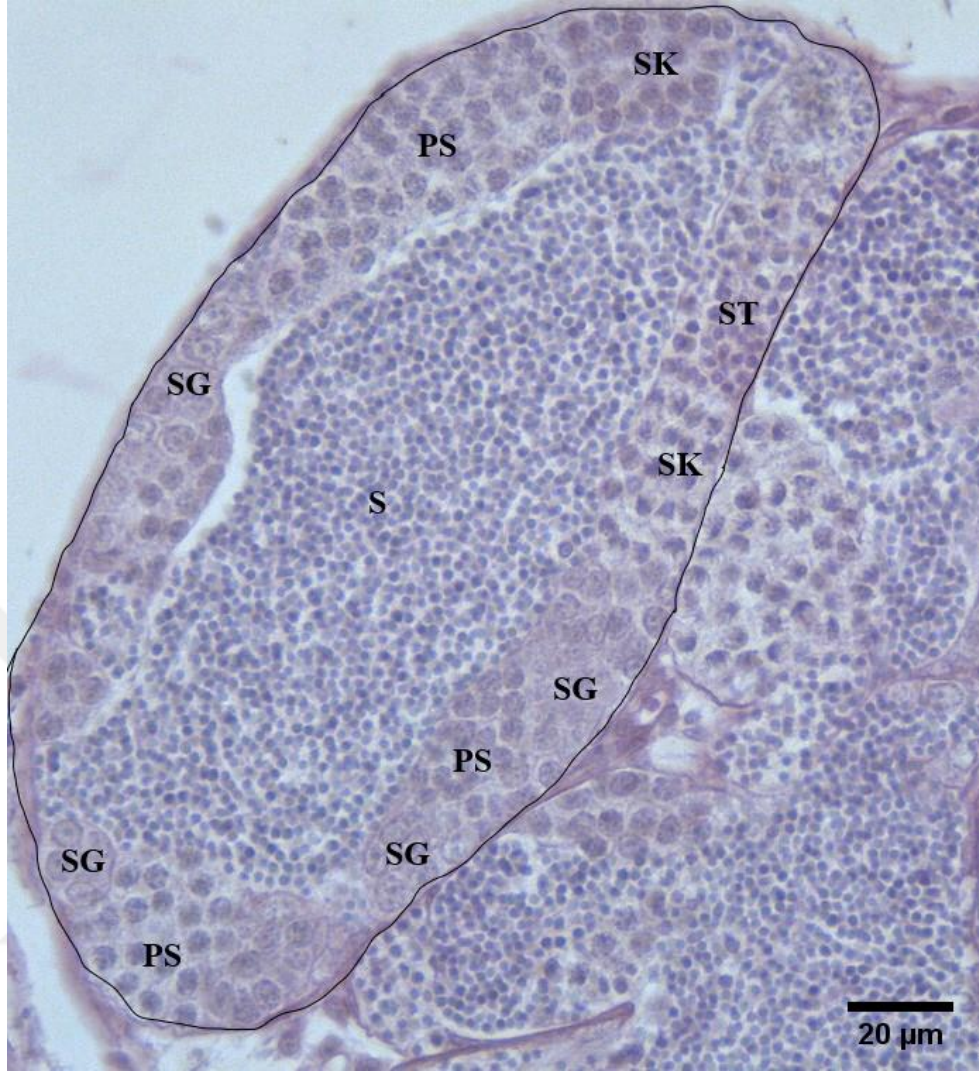
İŞLEM	UYGULAMA SÜRESİ
Parafinden kurtarma Ksilol	2x3 dk
Hidratasyon • %100 ETANOL • %90 ETANOL • %70 ETANOL	3 dk 30 sn 30 sn
Çeşme suyu altında	30 sn
Harris Hematoksilen	1 dk/50 sn
Distile su	4 dk
%95 Etanol	30 sn
Eozin	1 dk
%100 Etanol	2x1,5 dk
Ksilol	45 sn
Entellan ile kaplama	

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kontrol Grubu

Işık mikroskobu incelemelerinde zebra balığı kontrol gruplarından alınan testis dokusunda çok sayıda seminifer tübül yapılarına rastlandı (Şekil 4.1.). Spermatogenetik seriye ait hücre kümeleri görüldü. Spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatit, sperm hücreleri görüldü.

Spermatogenik hücrelerin en büyük boyutuna sahip olan spermatogonyumlar genellikle solgun veziküler yapıda oval şekilli bir çekirdeğe, farklı yapıda nükleer membrana, granüler sitoplazma yapısına sahipti. Primer spermatosit evresinde hücre hacminde küçülme izlendi. Spermatogonyuma göre orta büyüklükte bir hücre boyutuna, yoğun bir çekirdeğe ve belirsiz bir sitoplazmaya sahipti. Sekonder spermatosit aşamasında büyük çekirdekli hücre hacminin primer spermatosite oranla küçüldüğü gözlemlendi. Spermatit aşamasındaki hücre boyutu spermatositlere oranla belirgin düzeyde küçüldüğü izlendi. Spermilerin seminifer tübül içinde merkezi kısımda toplandıkları görüldü. Bu hücrelerin koyu, yuvarlak çekirdekli olduğu ve sitoplazmalarının seçilemediği tespit edildi.

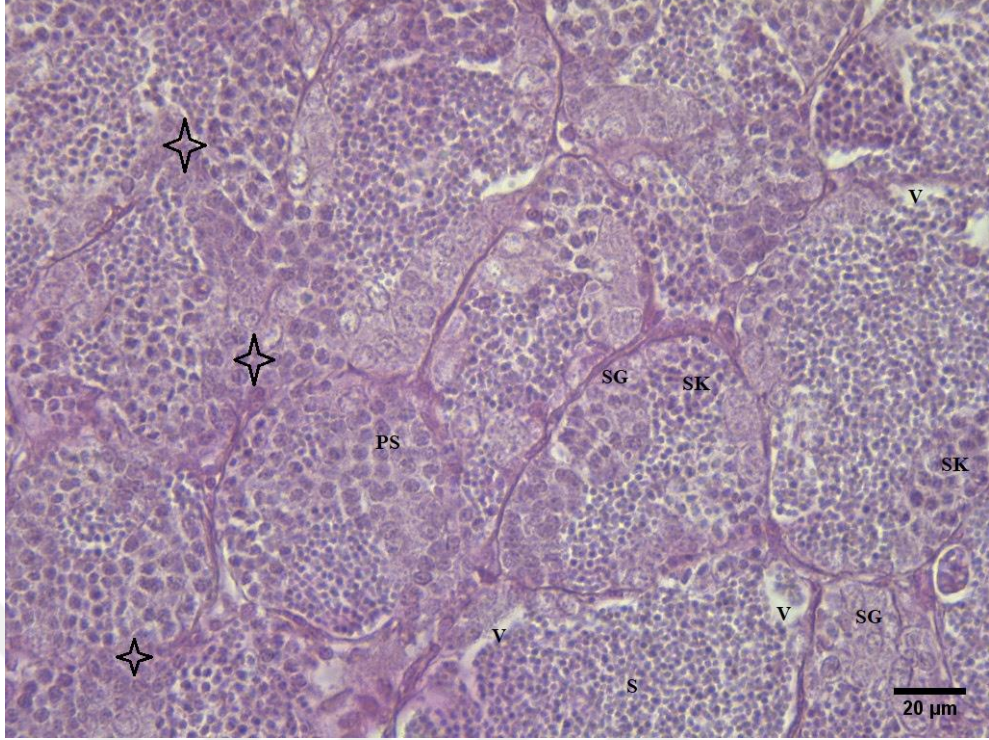


Şekil 4.1. Kontrol Grubunda Testis Dokusu Genel Yapısı. Sperm (S), spermatogonyum (SG), primer spermatosit (PS), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40

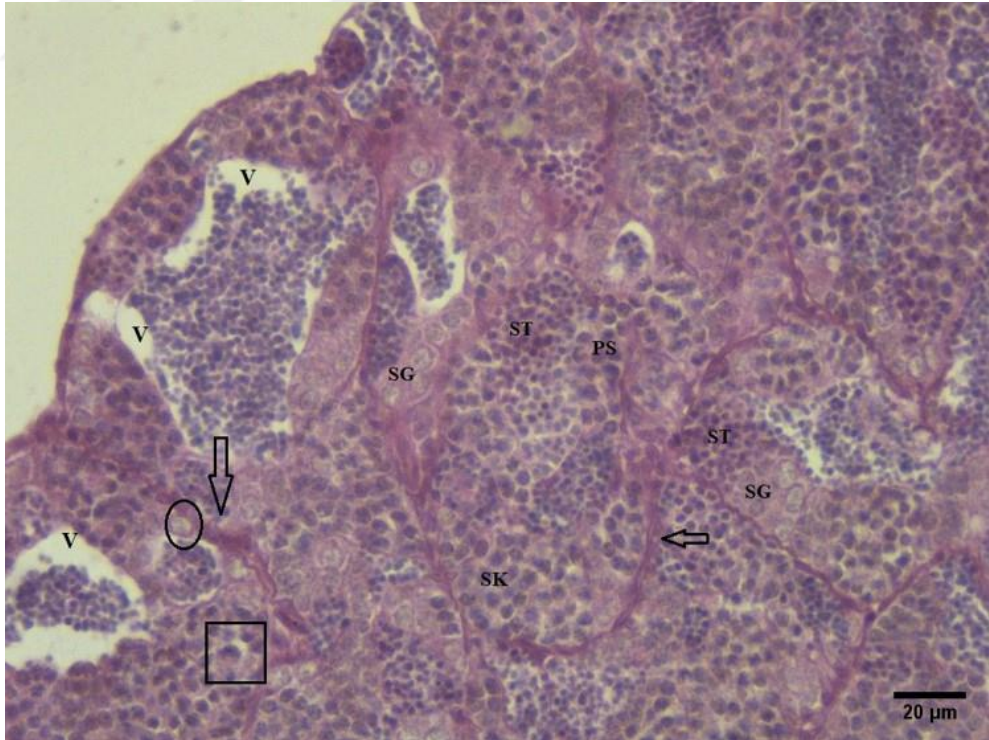
4.2. ENU Maddesi ile Bir Saat Maruz Kalan Dozlar

4.2.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup

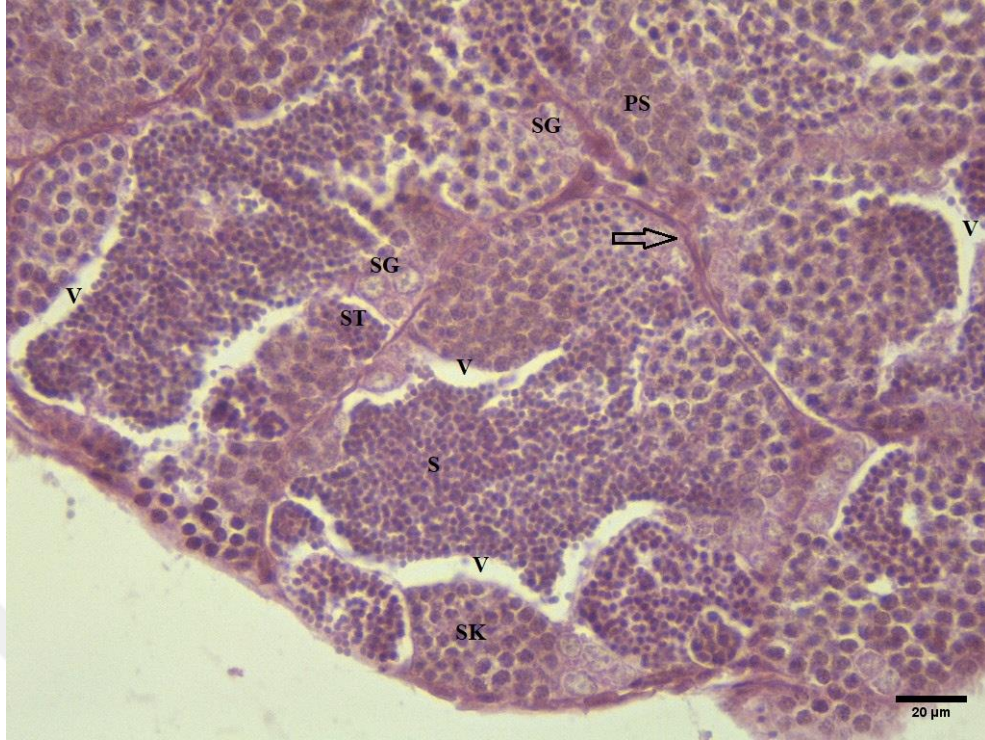
Kontrol grubu ile 0,25 mM ENU maddesi uygulanmış deney grupları karşılaştırıldığında; seminifer tübül yapıların bozulduğu ve sınırların kaybolduğu görüldü (Şekil 4.2.-4.3.-4.4.). Seminifer tübüllerde vakuolizasyon tespit edildi (Şekil 4.2.-4.3.-4.4.). Tübüller arası bazal laminada kalınlaşma gözlemlendi (Şekil 4.3.-4.4.). Spermatogenetik hücre kümelerinin sınırları tam olarak seçilemedi (Şekil 4.2.-4.3.). Bazı spermatogonyum hücrelerinde ve primer spermatosit hücrelerinde hipertrofi görüldü (Şekil 4.3.).



Şekil 4.2. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübül bütünlüğünün bozulması (dört köşeli yıldız), seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), sperm (S), spermatogonyum (SG), primer spermatosit (PS), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40.



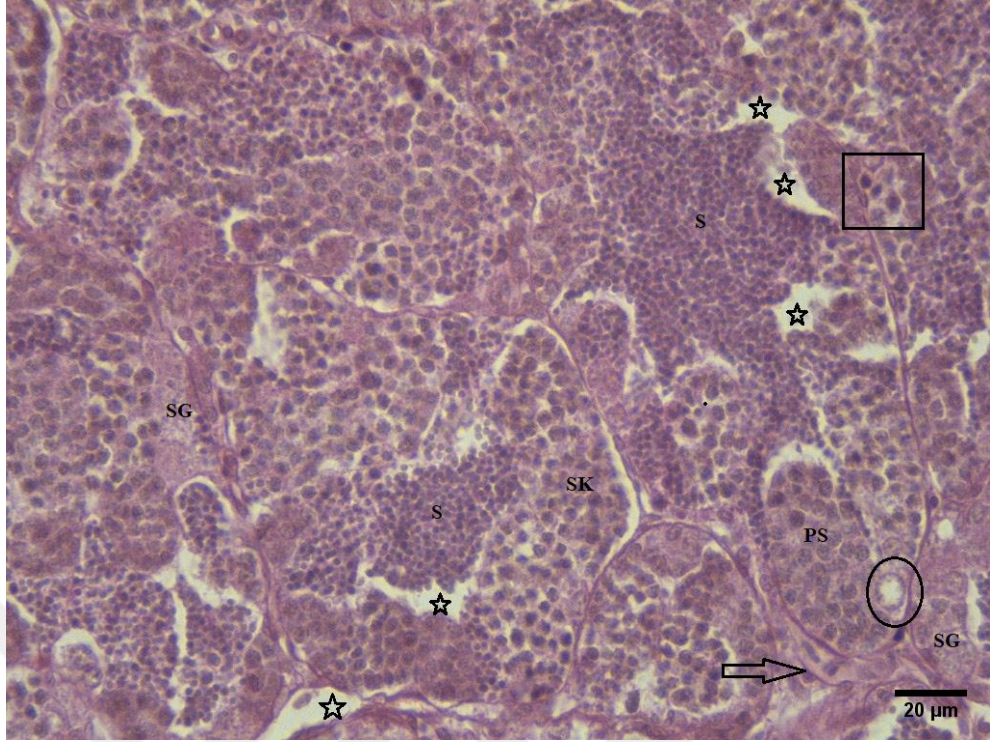
Şekil 4.3. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübüllerde vakualizasyon (V), seminifer tübüller arası bağ dokusu artışı (ok), spermatogonyum hücresinde hipertrofi (çember), primer spermatosit hücrelerinde hipertrofi (kare), sperm (S), spermatogonyum (SG), primer spermatosit (PS), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40.



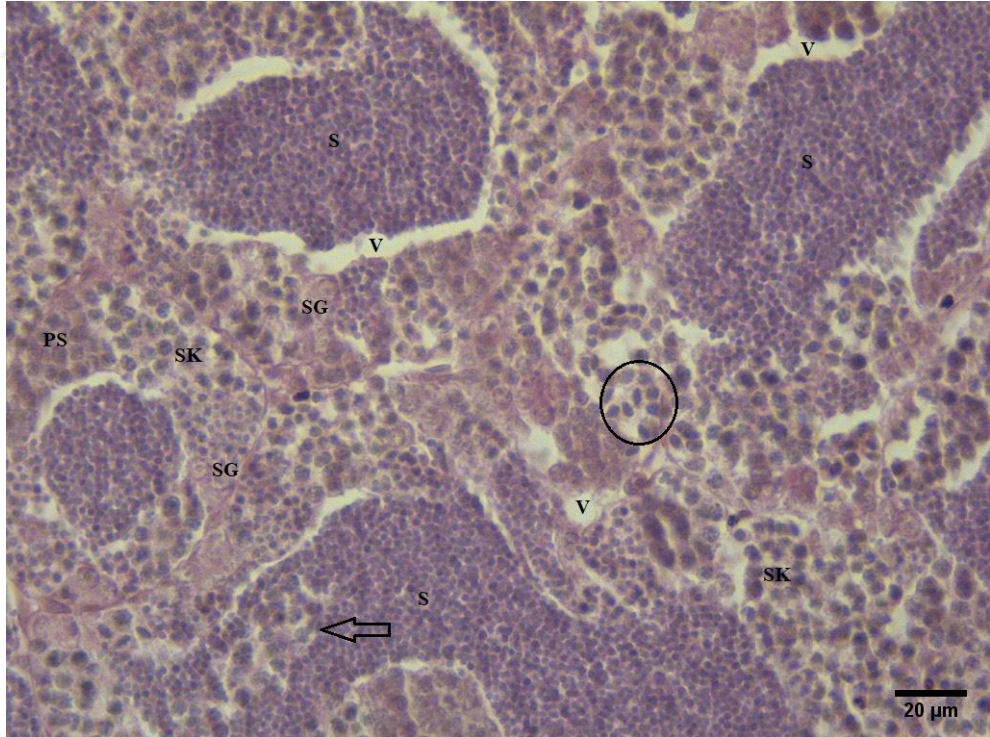
Şekil 4.4. 0,25 mM ENU'ya bir saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübüllerde vakualizasyon (V), seminifer tübüller arası bazal lamina kalınlaşması (ok), sperm (S), spermatogonyum (SG), primer spermatosit (PS), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40.

4.2.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup

0,50 mM 1 saatlik ENU maddesi uygulanmış deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; seminifer tübül bütünlüğünün bozulduğu, vakuolizasyonun arttığı gözlemlendi (Şekil 4.5.-4.6.). Seminifer tübüller arası bazal laminanın arttığı görüldü (Şekil 4.5.). Spermatogonyum hücrelerinde hipertrofi izlendi (Şekil 4.5.). 0.25 mM 1 saatlik doz grubuna kıyasla piknotik hücrelerde artış tespit edildi (Şekil 4.5.-4.6.). Spermatogonyum hücrelerinde ve primer spermatositlerde azalma görüldü (Şekil 4.6.). Ayrıca spermatogenetik hücre kümelerinin sınırlarında bozulmalar gözlemlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. 0,50 mM ENU'ya bir saatlik maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübüllerde açılma (yıldız), spermatogonyum hücrelerinde hipertrofi (çember), piknotik hücre (kare), seminifer tübüller arası bazal laminada artış (ok), sperm (S), primer spermatit (PS), spermatogonyum (SG), H&E Boyama, x40.

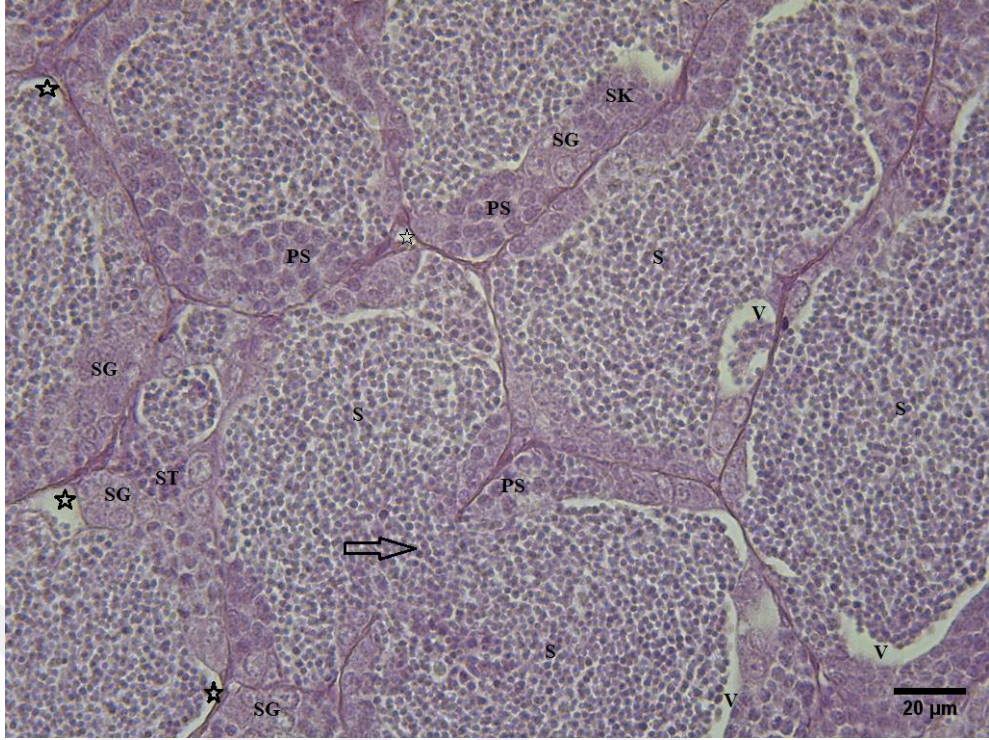


Şekil 4.6. 0,50 mM ENU'ya bir saatlik maruz kalan testis dokusu. Seminifer tübül bütünlüğünün bozulması, seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), spermatogenetik hücre kümelerinin sınırlarında bozulma (ok), spermatogonyum hücrelerinde (SG) ve primer spermatositlerde (PS) azalma, piknotik hücrelerde artma (çember), sperm (S), primer spermatosit (PS), Sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40.

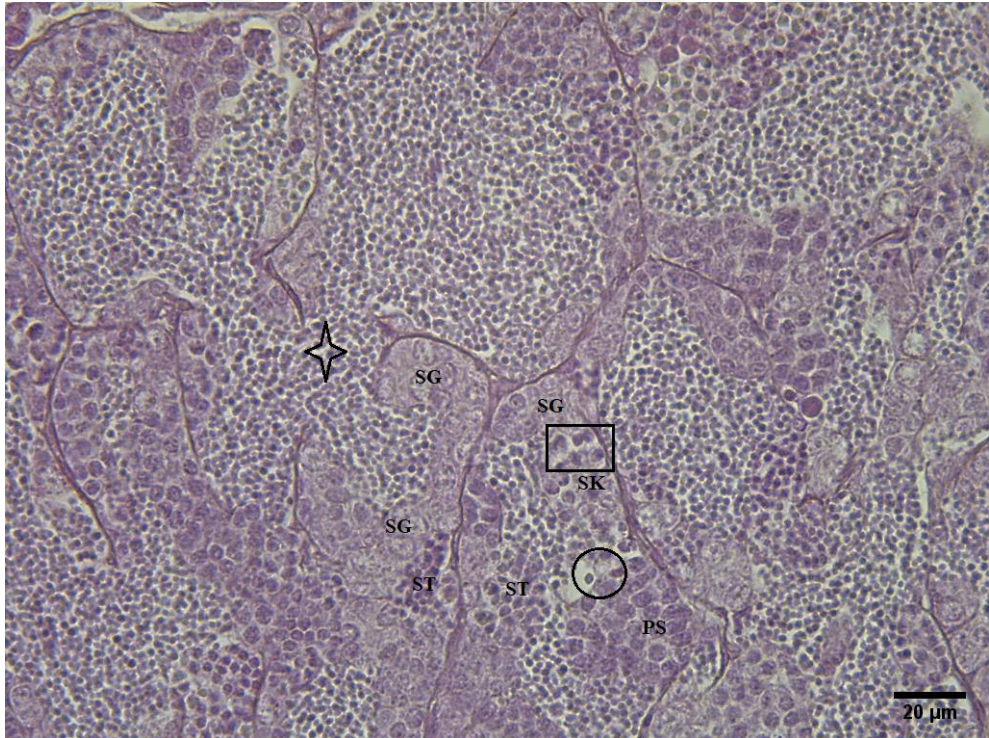
4.3. ENU Maddesi İki Saat Maruz Kalan Dozlar

4.3.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup

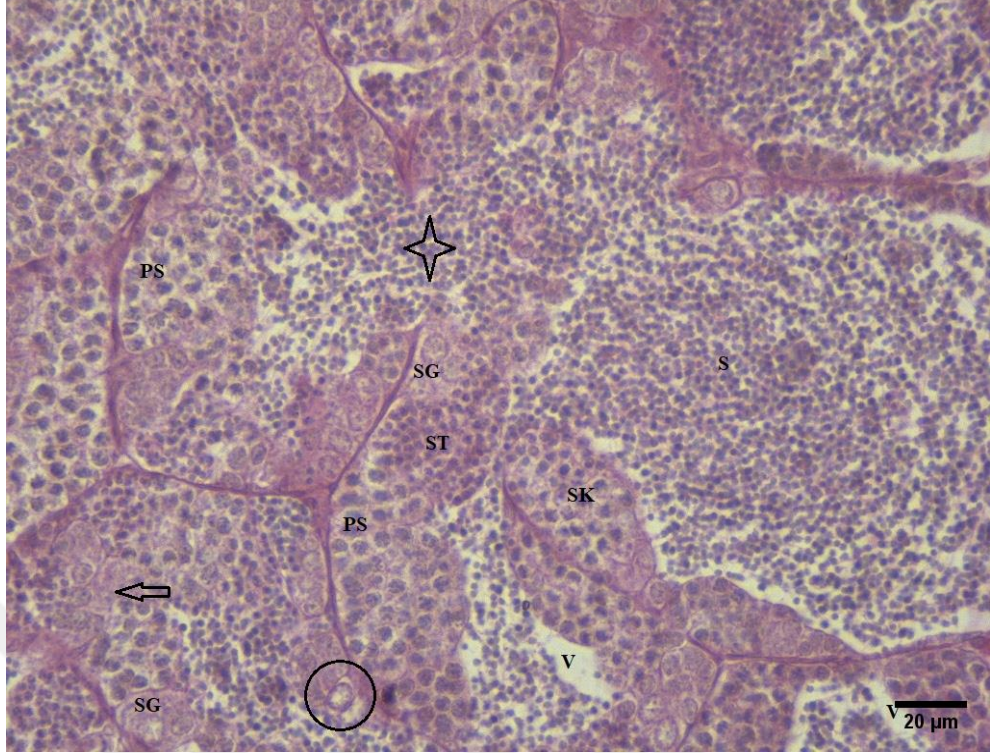
İki saat 0,25 mM ENU'ya maruz kalmış deney grubuyla bir saat 0,25 mM maruz kalan testis dokusunu karşılaştırdığında, seminifer tübül bütünlüğünün bozulması ve seminifer tübüllerde vakuolizasyonlar daha belirgindi (Şekil 4.7.-4.8.-4.9.). Ayrıca piknotik hücrelerin varlığı tespit edildi (Şekil 4.8.-4.10.). Seminifer tübül kaynaşması görüldü (Şekil 4.7.-4.8.-4.9.-4.10.) 0,25 mM 1 saatlik gruba kıyasla seminifer tübülde açılmalar tespit edildi (Şekil 4.7.). Bazı seminifer tübüllerde spermatogenetik seriye ait spermatogonyum ve sekonder spermatosit kümelerinde azalmalar izlendi (Şekil 4.8.). Bazı sekonder spermatosit hücrelerinde hipertrofi görüldü (Şekil 4.8.). Yer yer hücre küme sınır gruplarının kaynaşmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.9.). Spermatogonum hücrelerinde ve primer spermatosit hücrelerinde genel olarak hipertrofi tespit edildi (Şekil 4.9.). Seminifer tübüller arası alanda kanlanma izlendi (Şekil 4.10.). Apoptoza uğramış spermatogonyum hücresi görüldü (Şekil 4.10.). Sperm hücresinde artış izlendi (Şekil 4.10.).



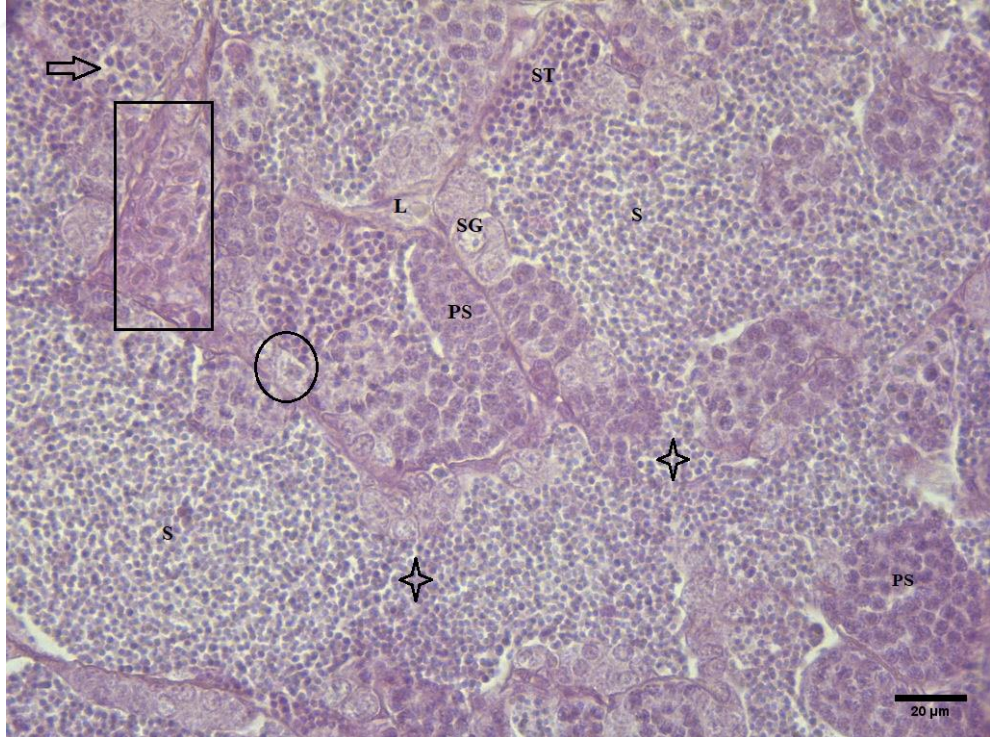
Şekil 4.7. 0,25 mM ENU'ya iki saatlik maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübüllerde açılma (Yıldız), seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), seminifer tübül kaynaşması (ok), sperm (S), spermatogonyum (SG), primer spermatosit (PS), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), H&E Boyama, x40.



Şekil 4.8. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Spermatogonyum ve sekonder spermatosit hücrelerinde azalma, seminifer tübüllerde birleşme (dört köşeli yıldız), piknotik hücreler (çember), sekonder spermatosit (SK) hücrelerinde hipertrofi (kare), spermatit (ST), sperm hücresi (S), primer spermatosit (PS), H&E Boyama, x40.



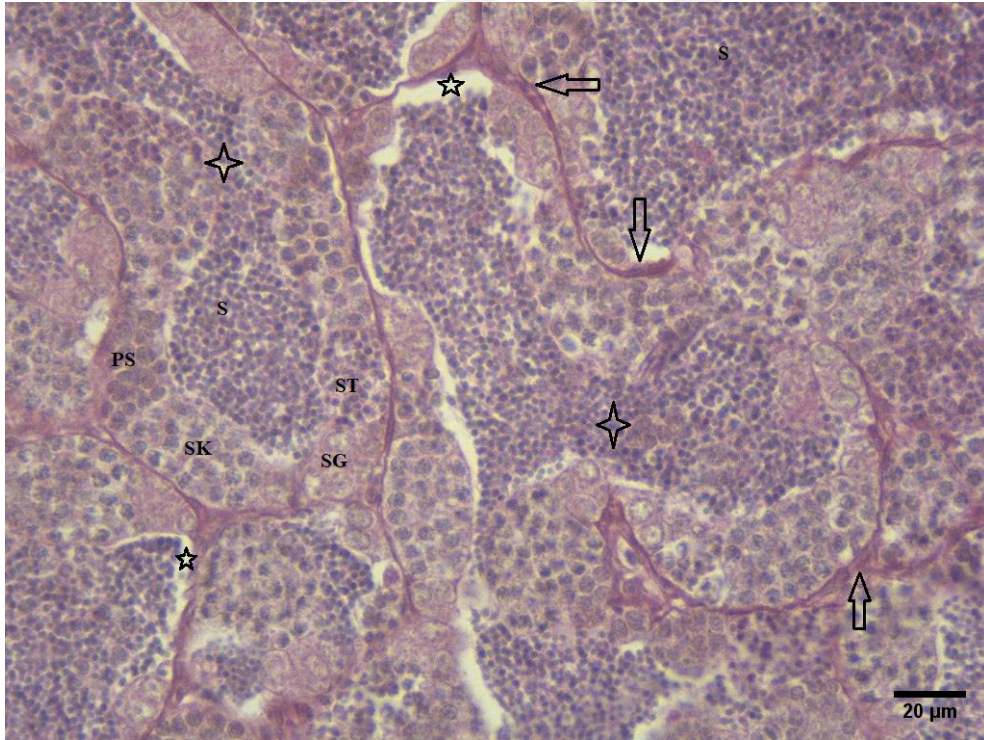
Şekil 4.9. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testis dokusu. Seminifer tübüllerde birleşme (dörtlü yıldız), bazı hücre kümelerinin sınır gruplarında kaynaşma (Ok), spermatogonyum hücrelerinde hipertrofi (çember), seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), spermatit (ST), sekonder spermatosit (SK), sperm hücresi (S), primer spermatosit (PS), H&E Boyama, x40.



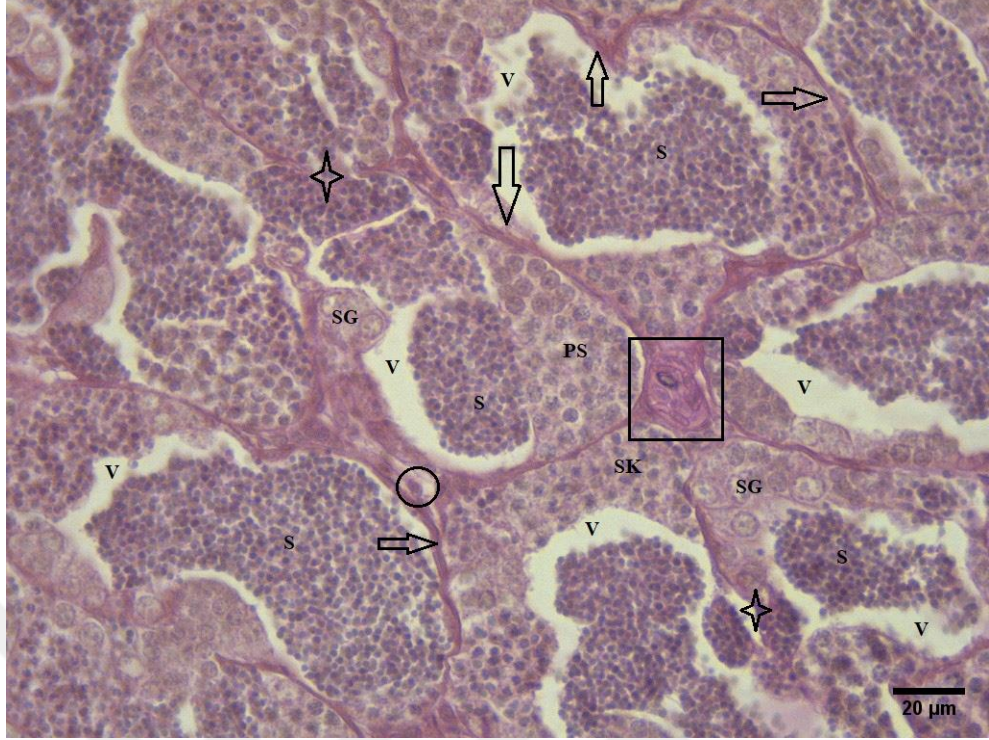
Şekil 4.10. 0,25 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testisi dokusu. Seminifer tübüllerde birleşme (dörtlü yıldız), seminifer tübüller arası alanda kanlanma (dikdörtgen), piknotik hücreler (Ok), apoptoza uğramış spermatogonyum hücresi (çember), sperm hücresinde artış (S), primer spermatosit (PS), Leydig Hücresi (L) H&E Boyama, x40.

4.3.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup

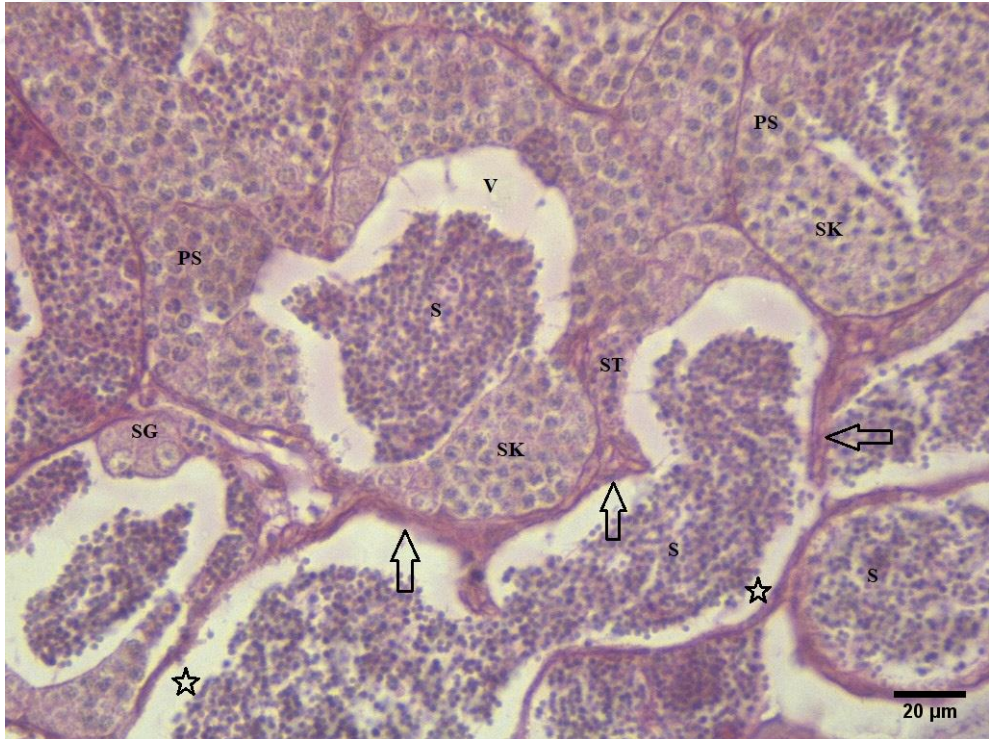
0,50 mM 2 saatlik ENU 'ya maruz kalan gruplarda ise seminifer tübüllerde vakuolizasyon ve dejenerasyonların diğer doz gruplarına göre daha ileri boyutta olduğu gözlemlendi. Genel olarak seminifer tübüllerde yapısal bozulma ve birleşme görüldü (Şekil 4.11.-4.12.4.13.). Seminifer tübüller içi alanda vakuolizasyon diğer doz gruplarına göre şiddetli olduğu tespit edildi (Şekil 4.11.-4.12.-4.13.). Bağ dokuda kanlanma izlendi (Şekil 4.12.). 0,50 mM ENU 1 saatlik doz grubuna göre bazal laminada meydana gelen kalınlaşmanın daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 4.11.-4.12.-4.13.). Primer spermatosit sayısında artış izlendi (Şekil 4.11.). Leydig hücrelerinde hipertrofi tespit edildi (Şekil 4.12.). 0,50 mM 1 saatlik doz grubuna kıyasla sekonder spermatositlere ait hücrelerde ve spermatogonyum hücrelerinde belirgin azalma izlendi (Şekil 4.13.).



Şekil 4.11. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testisi dokusu. Seminifer tübüllerde yapısal dejenerasyon, seminifer tübüllerde vakuolizasyon (yıldız), seminifer tübüllerde birleşme (dörtlü yıldız), primer spermatosit sayısında artış (PS), bazal laminada kalınlaşma (ok), sperm hücreleri (S), spermatogonyum hücreleri (SG), H&E Boyama, x40.



Şekil 4.12. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testisi dokusu. Seminifer tübüllerde yapısal birleşme (dörtlü yıldız), seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), bazal laminada yer yer kalınlaşma (ok), Leydig hücrelerinde hipertrofi (çember), bağ dokuda kanlanma (kare) sperm hücreleri (S), spermatogonyum hücreleri (SG), H&E Boyama, x40.



Şekil 4.13. 0,50 mM ENU'ya iki saat maruz kalan zebra balığı testisi dokusu. Seminifer tübüllerde yapısal dejenerasyon, sekonder spermatositlerde (SK) ve spermatogonyum (SG) hücrelerinde azalma, seminifer tübüllerde vakuolizasyon (V), seminifer tübüllerde açılma (Yıldız), bazal laminada yer yer kalınlaşma (ok), sperm hücreleri (S), H&E Boyama, x40.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Balıkların üreme potansiyeli ile ilgili yapılan araştırmalarda histolojik incelemeler büyük bir öneme sahiptir. Ayrıca gonadlarla ilgili yapılan çalışmalarda gonadların histolojik yapısının kirliliğe duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Gonadlarda gözlenen yapısal ve histolojik, fizyolojik değişimlerle kirlilik miktarları arasındaki bağlantılar, ortamdaki kirlilik seviyelerinin belirlenmesinde önemlidir (Önen ve Üçüncü, 2015).

Bu çalışmada N-Nitrozo bileşiklerinden biri olan N-Nitrozo-N-Etilüre (ENU) maddesinin zebra balığının testis dokuları üzerindeki histolojik etkileri araştırılmıştır. ENU maddesi uygulan zebra balığı testis dokusunda uygulanan doz miktarıyla orantılı olarak, seminifer tübüllerde dejenerasyon, seminifer tübüllerde vakuolizasyon, seminifer tübüllerde açılma, seminifer tübül bütünlüğünün bozulması, spermatogenetik seride yer alan hücre kümelerinde sınırlarının ve dağılımlarının bozulması, seminifer tübül alanda kanlanma, bağ dokuda kanlanma, spermatogenetik hücre sayılarında azalmalar, spermatogenik hücre gruplarında vakuolizasyon, bazı hücrelerde hipertrofi ve spermatogonyum hücrelerinde apoptoz görülmüştür. Ayrıca seminifer tübül çevresindeki bazal laminada kalınlaşma, doz grubuna bağlı olarak sperm sayısında artış ve yer yer piknotik hücrelerde tespit edilmiştir.

ENU'nun kanserojen etkisinin görmek için yapılan bir çalışmada, zebra balıkları 2,5 mM veya 3,0 mM ENU ile maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda ENU'nun zebra balığında epidermal papillomlar (deri yüzeyinde çıkıntılar) geliştirdiği gözlenmiştir. Bu çalışma zebra balıklarının, deri tümörlerinin incelenmesi için deneysel bir model olarak uygulanabilirliğini ortaya konulmuştur (Beckwith ve ark., 2000).

Oreochromis niloticus (Nil tilapi) ve *Lates niloticus* (Nil levreği) balıklarının belirli miktarlarda bazı ağır metallere (Fe, Zn, Cu, Pb, Cd ve Co) maruz kalması sonucu, solungaç, bağırsak, testis, kalp gibi organlarında histolojik değişimler tespit edilmiştir.

Bu çalışmaya göre ağır metallere maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* ve *Lates niloticus* balıklarının testis dokularında seminifer tübüllerde dejenerasyon, sperm sayısında azalış ve nekroz alanları tespit edilmiştir (Mohamed, 2008). Bizim çalışmamız ve bu çalışma sonuçları göz önüne alındığında, farklı kimyasal maddelerin, ağır metallerin ve kirleticilerin testis dokusunda histopatolojik etkiler ortaya koyduğu görülmüştür.

Di (2-etilheksil) ftalatın (DEHP) erkek zebra balıklarının (*Danio rerio*) üreme sağlığı üzerindeki etkilerini araştıran bir çalışmada zebra balıklarına intraperitoneal enjeksiyonla 10 gün boyunca 0,5, 50 ve 5000 mg/kg DEHP ile maruz bırakılmıştır. Yüksek DEHP konsantrasyonlarına maruz kalmanın yetişkin zebra balıklarında spermatogenezi bozduğunu ve bunun sonucunda tedavi edilmeyen dişiler tarafından oluşturulan oositlerin dölleme yeteneğinin azaldığını göstermiştir. 50 ve 5000 mg/kg DEHP'e maruz kalma, testiste spermatogenez oranının azalması ve spermatozoa oranının artması dahil olmak üzere, spermlerin spesifik gelişimlerinin farklı aşamalarında germ hücrelerinin oranında değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir (Uren-Webster ve ark., 2010). Bu çalışma ile bizim çalışmamız karşılaştırıldığında, uygulanan kimyasalların artan doza bağlı olarak etkisini arttırdığı ve germ hücreleri sayılarında değişiklikler meydana getirmesi bakımından benzer sonuçlar göstermektedir.

ENU maddesine maruz bırakılan ot sazanının (*Ctenopharyngodon idellus*) sperm hücreleri üzerine mutajenik etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada, ENU maddesi uygulanan balık sperm hücreleri ile dölleme sonucu meydana gelen ve gelişen embriyolarda, morfolojik olarak anormal değişikliklerin ve embriyo gelişimi üzerinde artan dozlara oranla belirgin etkilerin olduğu görülmüştür. Ot sazanlarında ENU maruziyetinin neden olduğu baskın fenotipler, sinir sistemi ve iç organ gelişimi gibi embriyonik gelişim süreçlerinin bozulmasına neden olmuştur. Morfolojik olarak, kısa omurga, çarpık bir kuyruk, küçük kafa ya da kafa olmaması, sinir sistemi anormallikleri olarak da kalbin yer değiştirmesi ve perikardiyal boşluk tespit edilmiştir. Bunun sebebi olarak da artan ENU dozu ile öldürücü mutasyon dozunun doğru orantılı olduğu görülmüştür (Jiang ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda ENU

konsantrasyonun artmasıyla testis dokusunda meydana gelen, seminifer tübül alanda kanlanma, spermatogenetik hücre sayılarında azalmalar, spermatogenik hücre gruplarında vakuolizasyon, bazı hücrelerde hipertrofi ve spermatogonyum hücrelerinde apoptoz gibi histolojik deformasyonları ortaya konmuştur.

Deltametrin maddesi uygulanan *Xiphophorus helleri* (Kılıçkuyruk balığı) testis dokularında meydana gelen histopatolojik etkileri inceleyen bir çalışmada, *Xiphophorus helleri* 72 saat boyunca 0,02 ppm ve 0,04 ppm konsantrasyonlarında deltametrin maddesine maruz bırakılmıştır. Balıkların testis dokularında kontrol grubuna göre çeşitli bulgulara rastlanmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak deney gruplarında sperm hücrelerinde azalma, seminifer tübüllerde dejenerasyon izlenmiştir (Yön ve ark., 2012). Ortaya çıkan sonuçlar bu çalışmadaki sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Ham petrolün suda çözünebilen kısımlarının *Xiphophorus helleri* (Kılıçkuyruk balığı) testis dokusundaki akut etkilerinin ortaya konduğu bir çalışmada, %10, %20, %40 konsantrasyonlarda ve 24, 48, 72 ve 96 saat süreyle ham petrolün suda çözünebilen kısımlarına, maruz bırakılan kılıç kuyruk balığının, konsantrasyon ve maruziyet süresi artışına paralel olarak tüm deneme gruplarının, testis dokusunda yaygın hemoraji (kanama) ve vakuolizasyon, seminifer tübüllerde ayrılma, nekroz, Sertoli hücrelerinde artış, yer yer kümelenme tespit edilmiştir (Önen ve Üçüncü, 2015). Bu çalışma ile ortaya çıkan sonuçlar bizim çalışmada bulduğumuz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Bisfenol A (BPA) maddesine 14 gün boyunca maruz kalan zebra balığının testislerinde morfolojik değişiklikler meydana gelmiştir. Sertoli hücrelerin yüzdesinde bir artış ve belirli bir konsantrasyondan sonra (100 µg /L) izlenen üreme hücrelerinin yüzdesinde belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda testislerde meydana gelen morfolojik değişiklikler, BPA'nın artan konsantrasyona bağlı olarak, bağ dokusunda kalınlaşma ve kan damarları gözlenmiştir. (Lora ve ark., 2016). BPA ile yapılan çalışmadaki sonuçlar ile bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar bağ dokusunun kalınlaşması yönünden benzerlik göstermektedir. Ayrıca artan doz

miktarlarına bağı olarak balığın üreme sağığı üzerinde olumsuz etkilerinin olduğunu da ortaya koymuştur.

Titanyum dioksit (TiO₂) maddesi kullanarak yapılan bir çalışmada, zebra balığına uygulanan doz gruplarının artışına bağı olarak testis dokusunda, spermatogonyum ve spermatosit hücrelerinde azalma, artan dozla birlikte seminifer tübüllerde bozulma, parçalanma, düşük dozlarla (1 mg/L) karşılaştırıldığında bu histopatolojik etkilerin artan düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Yüksek doza (4 mg/L) maruz kalan zebra balığı testis dokularında ise spermatogontum, spermatosit ve spermatit hücrelerin azaldığı görölmüştür. Semifer tübüller arasındaki bağı dokunun kaybolduğu gözlenmiştir (Akbulut ve Yön, 2016). Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar ile tez çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldığında, artan doz miktarlarına bağı olarak dokuda meydana gelen histopatolojik etkiler paralellik göstermektedir.

Bisfenol A (BPA) veya 17β-estradiol (E2) maddeleri kullanılarak yapılan bir çalışmada bir deniz balığı olan *Cynoglossus semilaevis*'in (Tek dil balığı) karaciğer ve testis dokuları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. 100 mg/kg BPA uygulanan testis dokularında hafif ve orta derecede hasar belirtilmiş, 200 mg/kg BPA'ya maruz kalan *C. Semilaevis*'in testislerinde ileri düzeyde hasar tespit edilmiştir. 100 mg/kg BPA' ya maruz kalan *C. semilaevis*'in testislerinde şişmiş Sertoli hücreleri, sperm sayısında artış ve parçalanmış kuyruk yapısı tespit edilmiştir. 200 mg/kg BPA'ya maruz bırakılan *Cynoglossus semilaevis*'in testis dokularının seminifer tübüllerinde dejenerasyon, atrofi (küölmüş) olan bazı hücreler, dejenere olmuş Leydig hücreleri, özönmüş hücre zarı ve deforme olmuş spermier tespit edilmiştir. 10 mg/kg E2'ye maruz bırakılan *Cynoglossus semilaevis*'in testis dokularında koyu renkli, bazofilik çekirdekler, şişmiş hücreler, sperm başlarının neredeyse tamamen deforme olduğu ve kuyrukların kıvrıldığı tespit edilmiştir. Bu alışma aynı zamanda dozu arttırılan maddelerin kimyasal yapısına bağı olarak dokularda oluşturduğu toksitite etkisinin de arttırdığını göstermektedir (Li ve ark., 2017). Bu çalışmadaki sonuçlar ile bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, konsantrasyonların artmasına bağı olarak, sperm sayısında artış, seminifer tübüllerde dejenerasyon olması gibi olumsuz etkileri yönünden benzerlik göstermektedir.

Çeşitli ürünlerde koruyucu olarak yaygın şekilde kullanılan Metil parapen (MP) zebra balığı, yarı statik durumda 21 gün boyunca dört (0.001, 0.01, 1 ve 10 mg L⁻¹) farklı doz grubu olarak maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda testis dokusunda, genel testiküler atrofi, çok çekirdekli germ hücreleri, bozulmuş germ hücresi, proliferasyon, Leydig hücresinde hiperplazi, interstisyel fibröz ve Sertoli hücrelerinde apoptozis olduğu tespit edilmiştir (Hassanzadeh, 2017).

Semicarbazide (SMC) maddesinin zebra balığı üreme sistemi üzerindeki etkilerini inceleyen bir çalışmada, zebra balıklarına 28 gün boyunca 4 doz grup şeklinde (1, 10, 100 ve 1000 g/L) SMC'ye maruz bırakılmıştır. 10 g/L'ye eşit veya daha az dozlarda SMC' ye maruz kalan balıklarda, kontrol grubuna kıyasla farklılıklar tespit edilmemiştir. Ancak 100 g/L doz grubunda, yoğun şekilde paketlenmiş sperm, seminifer tübüllerde boşluk oluşumu gözlenmiştir. 1000 g/L SMC'ye maruz kalan balıklarda ise az sayıda sperm gözlenirken, spermatositlerin düzensizleştiği ve testis dokusunda dejenerasyon tespit edilmiştir (Yu ve ark., 2017). Artan dozla orantılı olarak testis dokusunda meydana gelen doku harabiyeti, bizim çalışmamızda artan doz oranına bağlı olarak elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Zebra balıkları (*Danio rerio*) 5 gün boyunca farklı dozlarda mancozeb (5 ppm, 7,5 ppm) maddesine maruz bırakılarak testis dokusuna etkileri incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda seminifer tübüllerde dejenerasyonlar, seminifer tübül şeklinde bozulma tespit edilmiştir. Seminifer tübüllerde birleşmeler görülmüştür. Tübül yapılarında açıklıklar ve sperm hücre sayısında artış gözlenmiştir. Leydig hücrelerinde, sperm hücrelerinde ve spermatogenik hücre gruplarında vakuolizasyonlar izlenmiştir. Ayrıca spermatogenik hücre gruplarında yapısal bütünlüğün bozulduğu ve tübül yapılarının spermle dolu olduğu tespit edilmiştir (Gürol, 2019). Mancozeb ile yapılan çalışma sonuçları ile bizim çalışmamızın sonuçları benzerlik göstermektedir.

Günümüzde çeşitli süs bitkileri, meyve ağaçları ve sebzelerde olabilecek böcekleri uzaklaştırmak, arı kovanlarında bulunan parazitleri kontrol etmek amacıyla peptisit olarak kullanılan Fluvalinate maddesi ile yapılan bir çalışmada farklı dozlara (8 µg/l, 16 µg/l) maruz bırakılan zebra balığı testis dokusuna etkileri incelenmiştir. Çalışma

sonucunda Fluvalinate'a maruz bırakılan zebra balığı testis dokularında; seminifer tübül yapılarında bozulmalar, bağ dokusunda artış, spermatogenez serisinde yer alan spermatogonyum hücrelerinin azaldığı tespit edilmiştir (Öztürk, 2019). Bu çalışma sonuçları bizim yaptığımız çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak; farklı kimyasal maddelerin testis dokusu üzerinde doz artışlarına bağlı olarak histopatolojik bulguların belirginleştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada da kullanılan N-Nitrozo bileşiklerinden biri olan N-Nitrozo-N-Etilüre'nin (ENU) mutajenik ve kanserojenik bir madde olması yapılan farklı çalışmalarla ortaya konmuştur. Ancak bu çalışmayla birlikte zebra balığı testis dokusunda meydana gelen histopatolojik bulgular da tespit edilmiştir. Artan dozlarla orantılı olarak testis dokusunda meydana gelen değişiklikler, Nitrozo bileşiklerinin canlılar için risk oluşturan bileşikler içinde olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımız ENU'nun etki mekanizmasının desteklenmesi noktasında literatüre katkı sağlayacaktır. Balık testis dokusunda meydana gelen histopatolojik etkiler, omurgalıların gelişim mekanizmalarına ilişkin bilgileri tamamlayacak ve zenginleştirecektir. Bu bakımdan nitrozo bileşiklerine maruz kalınabilecek yerlerde, ekotoksikolojik risk analizlerinin belirli aralıklarla yapılması, gıda katkı maddelerinin kontrollerin sağlanması ve sağlığı riske atmayacak seviyelerde tutulması, halkı nitrozo bileşiklerine karşı bilinçlendirme çalışmaları sağlığımız açısından önemli bir adım olacaktır. N-Nitrozo bileşiklerinin infertiliye neden olabileceği göz önünde bulundurularak yeni çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

- 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, 25: 2991–2997.
- Alpbaz, A.G. 1990. Deniz Balıkları Yetiştiriciliği, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları, 1-334.
- Alpbaz, A.G. 1993. Akvaryum Tekniği ve Balıkları, Mas Yayıncılık, 285.
- Arukwe, A. 2001. Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. Marine Pollution Bulletin 42(8): 643–655.
- Bakkers, J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. Cardiovascular Research, 91(2): 279–288.
- Balling, R. 2001. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 2(1): 463–492.
- Beckman, M. 2007. Zebrafish take the stage in cancer research. Journal of the National Cancer Institute, 99(7): 500-501.
- Beckwith, L.G., Moore, J.L., Tsao-Wu, G.S., Harshbarger, J.C., Cheng, K.C. 2000. Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). Laboratory Investigation, 80(3): 379–385.
- Brand, M., Granato, M., Nüsslein-volhard, C. 2002 Keeping and raising zebrafish. In: Zebrafish: A Practical Approach. 1. Ed., Oxford University Press, Oxford, 7-37.
- Çakmak, Ö., İşleyen, A., Usca, A. 2009. N-Nitrozo bileşikleri ve halk sağlığına etkileri. TAF Preventive Medicine Bulletin, 8(6): 521-526.
- Carpio, Y., Estrada, M.P. 2006. Zebrafish as a genetic model organism. Biotechnologia Aplicada, 23(4): 265-270.
- Druckrey, H., Ivankovic, S., Gimmy, J. 1973. Cancerogenic effects of methyl and Ethyl-Nitrosourea (MNU and ENU) at single intracerebral and intracarotidal injection in newborn and young BD-rats. Zeitschrift für Krebsforschung und klinische Onkologie, 79(4): 282-297.
- Dutta, H.M., Dalal, R. 2008. The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish: a histopathological study (*Lepomis macrochirus*). Int. J. Environ. Res., 2(3): 215-224.
- Ekici, K., Alişarlı, M., Sancak, Y.C. 2008. Nitrite and nitrosamines in kind cheeses. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008(2): 71-72.

- Ekici, A. 2007. Dölllenmiş zebra balığı (*Danio rerio* (Hamilton- Buchanan, 1822)) yumurtalarına gen (Gfp) Transferi üzerinde bir araştırma. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi.
- Gilmour, D.T., Jessen, J.R., Lin, S. 2002. Manipulating gene expression in the zebrafish. In: Zebrafish : A Practical Approach. 1. Ed., Oxford University Press, Oxford, 121-43.
- Glaser, A. 2006. Threatened Waters Turning the tide on pesticide contamination. Beyond Pesticides. <https://www.beyondpesticides.org/assets/media/documents/documents/water.pdf>, Erişim Tarihi: 20 Kasım 2019.
- Goda, T., Abu-Daya, A., Carruthers, S., Clark, M.D., Stemple, D.L., Zimmerman, L.B. 2006. Genetic screens for mutations affecting development of xenopus tropicalis. PLoS Genetics, 2(6): e91.
- Gürol, M.A. 2019. Mancozeb maddesinin zebra balığının (*Danio rerio*) testis dokusu üzerine etkisi. Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Hardisty, R.E., Mburu, P., Brown, S.D.M. 1999. ENU mutagenesis and the search for deafness genes. British Journal of Audiology, 33(5): 279-283.
- Hassanzadeh, N. 2017. Histopathological evaluation of the zebrafish (*Danio rerio*) testis following exposure to methyl paraben. International Journal of Aquatic Biology, 5: 71-78.
- Hisaoka, K.K., Battle, H.I. 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton - Buchanan). Journal of Morphology, 102(2): 311-327.
- IARC 1972. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to man, v.1. World Health Organization, 135-140.
- Jiang, X.Y., Sun, C.-F., Zhang, Q.G., Zou, S.M. 2011. ENU-induced mutagenesis in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by treating mature sperm. PLoS ONE, 6(10): e26475.
- Justice, M. 2000. Mutagenesis Of The Mouse Germline. In: Mouse Genetics and Transgenics: A Practical Approach. 1 Ed., Oxford University Press, New York, 1-324.
- Justice, M.J., Carpenter, D.A., Favor, J., Neuhauser-Klaus, A., Hrabé De Angelis, M., Soewarto, D., Moser, A., Cordes, S., Miller, D., Chapman, V., Weber, J.S., Rinchik, E.M., Hunsicker, P.R., Russell, W.L., Bode, V.C. 2000. Effects of ENU dosage on mouse strains. Mammalian Genome, 11(7): 484-488.
- Justice, M.J., Noveroske, J.K., Weber, J.S., Zheng, B., Bradley, A. 1999. Mouse ENU mutagenesis. Human Molecular Genetics, 8(10): 1955-1963.
- Kanev, M.O. 2016. Beş farklı metal karışımının ergin zebra balığı (*Danio rerio*, Hamilton 1822) solungaç dokusunda oksidatif stres cevabı. Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.

- Kennedy, C.L., O'Bryan, M.K. 2006. N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) mutagenesis and male fertility research. *Human Reproduction Update*, 12 (3): 293-301.
- Knapik, E.W. 2000. ENU mutagenesis in zebrafish - from genes to complex diseases. *Mammalian Genome*, 11(7): 511-519.
- Koç, N.D., Teksöz, N., Ural, M., Akbulut, C. 2012. Histological structure of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) testicles. *Elixir Aquaculture*, 46: 8117-8120.
- Kutluyer, F., Aksakal, E. 2013. Sucul model organizmalar ve biyoteknolojide kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(2): 101-107.
- Leal, M.C., Cardoso, E.R., Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., Bogerd, J., França, L.R., Schulz, R.W. 2009. Histological stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction*, 81(1): 177-187.
- Li, F., Yao, L., Sun, W., Jiang, Y., Li, Z., Zhai, Y. 2017. Histopathological liver and testis alterations in male half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) exposed to endocrine disruptors. *Journal of Coastal Research*, 33(3): 678-683.
- Liu, J., Stainier, D.Y.R. 2012. Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circulation Research*, 110(6): 870-874.
- Lora, A.J., Molina, A.M., Bellido, C., Blanco, A., Monterde, J.G., Moyano, M.R. 2016. Adverse effects of bisphenol A on the testicular parenchyma of zebrafish revealed using histomorphological methods. *Veterinari Medicina*, 2016(10): 577-589.
- Ma, C., Parng, C., Seng, W.L., Zhang, C., Willett, C., Mcgrath, P. 2003. Zebrafish - an in vivo model for drug screening. *Innov. Pharmaceut Tech.*, 38-45.
- Mohamed, F. 2008. Bioaccumulation of selected metals and histopathological alterations in tissues of *Oreochromis niloticus* and *Lates niloticus* from lake Nasser. *Global Veterinaria*, 2(4): 205-218.
- Nagel, R. 2002. DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex*, (19 Suppl 1): 38-48.
- Noveroske, J.K., Weber, J.S., Justice, M.J. 2000. The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mammalian Genome*, 11(7): 478-483.
- Oliver, P.L., and Davies, K.E. 2012. New insights into behaviour using mouse enu mutagenesis. *Human Molecular Genetics*, 21(1): R72-R81.
- Önen, Ö., Üçüncü, S.İ. 2015. Ham petrolün suda çözünebilir kısımlarının *Xiphophorus helleri* Heckel, 1848 (Poeciliidae, Teleostei) Testis histolojisi üzerindeki etkileri. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(1): 59-68.
- Oruç, H.H. 2001. Bursa'da tüketilen bazı sebzelerde nitrat ve nitrit. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(3): 17-21.
- Öztürk, C. 2019. Fluvalinate'ın zebra balığı testis dokusunda etkisinin histolojik olarak incelenmesi. *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi*.

- Pelegri, F. 2002. Mutagenesis. In: Zebrafish : A Practical Approach. 1 Ed., Oxford University Press, Oxford, 145-74.
- Rice, J.M., Ward, J.M. 1982. Age dependence of susceptibility to carcinogenesis in the nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 381(1): 274-289.
- Rinchik, E.M. 1991. Chemical mutagenesis and fine-structure functional analysis of the mouse genome. *Trends in Genetics*, 7(1): 15-21.
- Şeftalioğlu, A. (1998). İnsan Embriyolojisi, 1.Cilt. Feryal Matbaası, 620.
- Serdaroğlu, M., Ergezer, H. 2015. Et ve et ürünlerinde nitrit-nitrat; kullanım avantajları, yasal sınırlamalar ve güncel alternatif yaklaşımlar. *Akademik Gıda*, 13(3): 257–264.
- Sigma-Aldrich. 2019. N-nitroso-N-ethylurea
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n3385?lang=en®ion=TR>, Erişim Tarihi: 29 Temmuz 2018.
- Singer, B., Dosanjh, M.K. 1990. Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 233(1–2): 45-51.
- Şişman, T., Geyikoğlu, F. 2010. PCB 126'ya maruz kalmış zebra balığı (*Danio rerio*) larvalarındaki sensorimotor hasarlar. *Tünav Bilim*, 3(1): 61-66.
- Slikker, W., Mei, N., and Chen, T. 2004. N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) increased brain mutations in prenatal and neonatal mice but not in the adults. *Toxicological Sciences*, 81(1): 112-120.
- Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Driever, W. 1994. Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. *Genetics*, 136(4): 1401-1420.
- Turp, G.Y., Sucu, Ç. 2016. Et Ürünlerinde nitrat ve nitrit kullanımına potansiyel alternatif yöntemler. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 12(2): 231-242.
- Uren-Webster, T.M., Lewis, C., Filby, A.L., Paull, G.C., Santos, E.M. 2010. Mechanisms of toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 99(3): 360-369.
- 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. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21(10): 2866-2870.
- Yu, M., Feng, Y., Zhang, X., Wang, J., Tian, H., Wang, W., Ru, S. 2017. Semicarbazide disturbs the reproductive system of male zebrafish (*Danio rerio*) through the GABAergic system. *Reproductive Toxicology*, 73(1): 149–157.
- Zhao, S., Huang, J., Ye, J. 2015. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 34(1): 1–9.

ÖZGEÇMİŞ

Meltem Yılmaz, 1989'da Kocaeli'de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kocaeli'de tamamladı. 2006 yılında 19 Mayıs Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2008 yılında başladığı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nü 2012 yılında bitirdi akabinde Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2015 yılında Millî Eğitim Bakanlığı'na Biyoloji Öğretmeni olarak atandı. Halen Kocaeli'de Biyoloji Öğretmeni olarak görev yapmaktadır.