

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**N-NİTROZO N-ETİLÜRE UYGULANAN ZEBRA
BALIĞI OVARYUMUNA HİSTOLOJİK ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Suna KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ

Eylül 2019

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

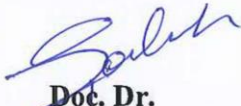
N-NİTROZO N-ETİLÜRE UYGULANAN ZEBRA BALIĞI OVARYUMUNA HİSTOLOJİK ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

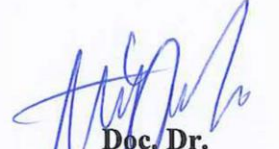
Suna KOÇ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

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


Doç. Dr.
H. Sibel ÖZESEN
ÇOLAK
Jüri Başkanı


Doç. Dr.
Nazan Deniz YÖN
ERTUĞ
Üye


Doç. Dr.
Hüseyin AKSOY
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu beyan ederim.

Suna KOÇ

06.09.2019

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğretimimde ve maddi, manevi tüm desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman azim ve disiplinle çalışmalarımı teşvik eden ve çalışmalarımın tüm aşamalarında bana yardımcı olan saygıdeğer ve değerli danışman hocam Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Deney çalışmalarım ve laboratuvar uygulamalarında bana yol gösteren sayın hocam Arş. Gör. Dr. Cansu AKBULUT'a teşekkür ederim.

Tez yazım ve araştırma konularında teknolojik yolları bana öğreten ve destek veren sayın Arş. Gör. Tarık DİNÇ'e teşekkür ederim.

Çalışmalarım bana güç veren ve her zaman yanımda olan, beni her zaman motive eden sevgili eşim Suat ÖZAKİ, minik oğlum Ömer Ali ÖZAKİ ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER	3
2.1. N–Nitrozo N-Etilüre.....	3
2.2. Model Organizma Olarak Zebra Balığının Kullanımı.....	4
2.3. Zebra Balığının Genel Özellikleri.....	5
2.4. Balıklarda Gonad Yapısı.....	7
2.5. Zebra Balığının Ovaryum Histolojisi.....	8
2.5.1. Oosit olgunlaşması.....	9
2.5.1.1. Primer oosit evresi.....	9
2.5.1.2. Kortikal alveolar evre.....	10
2.5.1.3. Previtellojenik evre.....	10
2.5.1.4. Vitellojenik evre.....	10
2.5.1.5. Olgunlaşma evresi.....	10

BÖLÜM 3.

MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal	12
3.1.1. Zebra Balığı.....	12
3.1.2. N–Nitrozo N-Etilüre	12
3.2. Yöntem	12
3.2.1. Deney düzeneği.....	12
3.2.2. Histolojik	13
Analizler.....	
3.2.2.1. Fiksasyon.....	13
3.2.2.2. Dehidrasyon.....	14
3.2.2.3. Şeffaflaştırma.....	14
3.2.2.4. Parafine gömme ve blok hazırlama.....	15
3.2.2.5. Kesit alma.....	15
3.2.3.	15
Boyama.....	
3.2.3.1. Hematoksilen-Eosin boyama	15
metodu.....	

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI	16
4.1. Kontrol	16
Grubu.....	
4.2. ENU Maddesi ile Bir Saat Maruz Kalan Dozlar.....	18
4.2.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup.....	18
4.2.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup	20
4.3 ENU Maddesi ile İki Saat Maruz Kalan Dozlar.....	22
4.3.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup.....	22
4.3.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup	26

BÖLÜM 5.

TARTIşMA VE SONUÇ

30

.....

KAYNAKLAR

33

.....

ÖZGEÇMİş

36

.....



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AO	: Atretik oosit
BD	: Bağ doku
COC	: Kortikal alveolar oosit
ENU	: N-nitrozo N-etilüre
FE	: Folikül epiteli
KP	: Karyoplazma
LC ₅₀	: Letal doz
mM	: Milimolar
OO	: Olgun oosit
PCG	: Primordial germ hücreleri
PO	: Primer oosit
O	: Ooplazma
VO	: Vitellojenik oosit
ZR	: Zona radiata
Mm	: Mikrometre
⁰ C	: Santigrat

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	3.1.	Deney	13
düzenegi.....			
Şekil 4.1. Kontrol grubu; ovaryum dokusu içinde yer alan oositler.....			16
Şekil 4.2. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			18
Şekil 4.3. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			18
Şekil 4.4. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			19
Şekil 4.5. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			19
Şekil 4.6. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			20
Şekil 4.7. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			21
Şekil 4.8. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			21
Şekil 4.9. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			22
Şekil 4.10. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			23
Şekil 4.11. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			24
Şekil 4.12. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			24
Şekil 4.13. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			25
Şekil 4.14. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu,.....			25
Şekil 4.15. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			27
Şekil 4.16. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			27
Şekil 4.17. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			28
Şekil 4.18. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			28
Şekil 4.19. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu.....			29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Bouin solüsyonunun hazırlanışı.....	14
Tablo 3.2. Işık mikroskobu için dehidratasyon uygulaması.....	14
Tablo 3.3. Işık mikroskobu için Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi.....	15

ÖZET

Anahtar kelimeler: Zebra balığı (*Danio rerio*), ovaryum, N-nitrozo N-Etilüre

N-nitrozo N-Etilüre (ENU) DNA alkilleyici olarak bilinen güçlü bir mutajendir. DNA’da bulunan baz çiftlerinin eşleşmesi sırasında bazların eşleşme dizisini bozarak DNA yapısına zarar verir. Ayrıca ENU belirli tümörleri indükleyen bir maddedir. Bu çalışmada ENU maddesinin zebra balıklarına uygulanarak, dişi zebra balıklarının ovaryumunda meydana gelen değişimler histolojik olarak araştırıldı.

Çalışma kapmasında 1 kontrol 4 deney grubu olmaz üzere toplam 5 grup oluşturuldu. Her grupta 4 adet dişi zebra balığı kullanıldı. Deney gruplarına 0.25 ve 0.50 mM’lık ENU uygulaması yapıldı. 1. ve 2. Deney grubu sadece 1 saat bu dozlara maruz bırakılırken, 3. Ve 4. deney grubu, 3 gün arayla 1+1 saat şeklinde 0,25 ve 0,50 mM’lık ENU’ya maruz bırakıldı. Beşinci günün sonunda tüm balıklar disekte edildi. Alınan zebra balığı ovaryum dokusuna rutin histolojik işlemler uygulandı. Histolojik incelemeler neticesinde ENU’ya maruz kalan dişi zebra balıkların ovaryumlarında değişimler görüldü.

0.5 mM ENU muamelesi sonucunda zebra balığı ovaryumunda, kontrol ve 0.25 mM lık gruba kıyasla oositlerde dejenerasyon, zona radiata da kalınlaşma, bağ doku artışı, gözlemlendi. N-nitrozo N-Etilüre (ENU) uygulamasının zebra balığı ovaryum dokusunda yapısında histopatolojik değişikliklere sebep olduğu tespit edildi. Bu değişimlere bağlı olarak dişi zebra balığının üreme kapasitesinde bozulma meydana geldiği görüldü.

HISTOLOGICAL EFFECTS OF N - NITROSO N-ETHYLUREA IN ZEBRA FISH OVARIUM

SUMMARY

Keywords: Zebrafish (*Danio rerio*), ovary, N-nitroso N-Ethylurea

N-nitroso N-ethyl (ENU) is a strong mutagen known as DNA alkylating. It interrupts the pairing sequence of bases during the pairing of base pairs in DNA and damages the DNA structure. In addition, ENU is a substance that induces certain tumors. In this study, the changes in ovarian Zebra fish ovary were applied to the Zebra fish of ENU and histologically investigated.

A total of 5 groups were formed, not one control and four experimental groups. Four female zebrafish were used in each group. 0.25 and 0.50 mM ENU was applied to the experimental groups. Experimental groups 1 and 2 were exposed to these doses for only 1 hour, while experimental groups 3 and 4 were exposed to 0.25 and 0.50 mM ENU in the form of 1 + 1 hour at 3-day intervals. At the end of the fifth day, all the fish were dissected. Routine histological procedures were applied to the zebrafish ovarian tissue. Histological examinations revealed changes in the ovaries of female zebra fish exposed to ENU.

As a result of 0.5 mM ENU treatment, degeneration of oocytes, thickening of zona radiata, increased connective tissue were observed in zebrafish ovarium compared to control and 0.25 mM group. N-nitroso N-ethyl (ENU) was found to cause histopathological changes in the zebrafish ovarian structure. Due to these changes, it was observed that malnutrition capacity of female zebrafish decreased.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Omurgalıların en alt grubu olan balıklar, gelişmiş organizasyonlu canlıların sistemlerindeki araştırmalar için oldukça önemli bir yer tutar. Sucul omurgalılar çevreden yayılan çeşitli faktörler diğer canlılardan daha fazla maruz kalmalarından dolayı balıklarla ilgili yapılan araştırmalar oldukça önemlidir. Son yıllarda çalışmalarda zebra balığı ve embriyoları sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Zebra balığının dayanıklı bir tür olması, kolay bulunması, laboratuvar ortamında kolay beslenebilmesi ve çoğalması, ergin dişilerin yüzlerce yumurta bırakabilmesi, dış döllenmeyle üremesi, yumurta ve embriyosunun saydam oluşu, yumurta ve larva gelişiminin kolay izlenebilmesi, jenerasyon zamanının kısa olması ve embriyolarının toksik ajanlara duyarlı oluşu nedenleriyle bilimsel çalışmalarda en sık kullanılan model organizmalardan biridir (Nagel, 2002).

ENU, mutajenlerin alkilleyici madde sınıfının bir üyesidir (Russell ve ark. 1979). N-nitrozo bileşikleri ve nitrozaminler kanser oluşumunu tetikleyen bileşiklerdir. Birçok deney hayvanı üzerinde kullanılmış ve kanserojenik özelliği görülmüştür. Sıçan, fare, zebra balığı gibi denekler üzerinde deneyler yapılmıştır. Bunun sonucunda toksik, teratojenik, mutajenik ve kanserojenik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. ENU ile yapılan çalışmalarda kullanılan doz oranı miktarı değiştikçe, deneklerde oluşan hasarlarda da farklılık gözlenmektedir. (Justice ve ark. 2000).

Zebra balığı ovaryumuna ENU'nun etkilerini incelemek için iki farklı dozda ENU (0,25 Mm, 0,50 mM) uygulaması yapıldıktan sonra histolojik yöntemlerle incelendi. Sonuç olarak 0.25 mM'lık doz grubunda bir saatlik ve iki saatlik uygulamalarda

genel olarak kortikal alveolar oositlerde çekirdekte bozulmalar izlendi. Vitellojenik oositlerde zona radiata ile folikül epiteli arasında ayrılmalar izlendi. Olgun oosit yapısında bozulmalar izlendi. Olgun oositlerde zona radiatada kalınlaşma izlendi. 0.50 mM'lık doz grubunda ise bir saatlik ve iki saatlik uygulamalarda genel olarak primer oositlerde zona radiata ile ooplazma arasında açılma izlendi. Vitellojenik oositlerde yapısal deformasyonlar izlendi. Olgun oositlerde zona radiata kalınlaşması izlendi.



BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. N-Etil-N-Nitrozüre

ENU, iyi bilinen bir DNA alkilleyici ajan ve güçlü kanserojendir. ENU ayrıca bir teratojen olarak da bilinir ve merkezi sinir sisteminde anomaliler ortaya çıkarır (Druckrey ve ark., 1967).

İlk olarak 1919'da N-etilüre ile nitroz asit reaksiyonu sentezlenmiştir. Saf formda, sarı-pembe kristaller ışığa duyarlıdır. (Knapik, 2000).

ENU mutagenesi, genomdaki rastgele nokta mutasyonlarını tanıtmak için yaygın olarak kabul edilen ve kanıtlanmış bir yöntemdir. DNA bazlarındaki oksijen veya azot atomlarını etki ederek mutajenik aktivitesini gösterir (De Bruijn ve ark., 2009).

ENU, bir mutajen olduğu kadar bir toksin ve kanserojendir ve suşlar, etkilerine karşı duyarlılıklarında farklılık gösterir. Bu nedenle, deneylerde kullanılacak suşlar için uygun bir mutajen, toksik olmayan ENU dozu belirlemek gereklidir (Justice, 2000).

Solnicave arkadaşlarının zebra balığı üzerinde yaptığı deney sonucunda, ENU'nun letal dozu belirlemiştir. 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 5 mM ENU dozlarını kullanarak yaptığı deneyde 4 mM ENU'ya maruz kalan balıkların %50'si ölmüştür. Bu nedenle LC₅₀ 4 mM olarak belirlenmiştir (Solnica ve ark, 1994).

2.2. Model Organizma Olarak Zebra Balığının Kullanımı

Zebra balığı insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Bunun nedenleri, zebra balığı ile insan ve diğer omurgalıların genom yapılarının benzer oluşu, metabolizmalarının ve embriyonik gelişimlerinin hemen hemen aynı olması, en önemlisi insanlarda bulunan tümör baskılayıcı genin zebra balığında da keşfedilmiş olmasıdır (Şişman ve Geyikoğlu, 2010).

Zebra balığı, üzerinde çalışılması zor olan diğer türler hakkındaki biyolojik olayların araştırılması ve bilgi edinilmesi ile insan ve diğer omurgalıların hastalıklarının araştırılmasında mükemmel bir model organizma olarak kullanılmaktadır (Van der Sar ve ark., 2004).

Zebra balığının genom yapısının, diğer omurgalı canlılar ve insan genomuna benzerlik göstermesi, metabolik faaliyetlerin ve embriyonik gelişim süreçlerinin oldukça benzer olması, embriyonal gelişimin mikroskop altında kolaylıkla izlenebilmesi, bu canlıların model organizma olarak kullanılmasında önde gelen sebeplerdendir (Din, 2002). Zebra balığı, bir tümör modeli olarak birçok avantaj sağlar. İnsan ile zebra balığı arasında genom, mRNA ve protein dizilerinin benzerlik göstermesi bu avantajlar arasındadır (Zhang ve ark., 2015). Zebra balığı basit bir akvaryum balığı olmaktan ziyade tıbbi araştırmalarda kullanılan, oldukça popüler bir omurgalı modeldir. Alzheimer, konjenital kalp hastalıkları, diabetes mellitus ve kanser gibi birçok hastalıkta araştırmalara modellik yapmış omurgalı bir türdür (Sarras ve ark., 2015). İnsana ait birçok hastalık ve gelişim genlerinin benzeri zebra balığının genomunda da vardır. 1.7 milyar baz çiftine sahiptir ve üretilebilen zebra balıkları insan hastalıkları için uygun bir modeldir (Kayhan ve ark., 2018).

Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından yönetilen omurgalı biyolojisi, fizyolojisi ve insan hastalıkları araştırmalarında genom çalışmalarında zebra balığını model sistem olarak seçilmiştir. Bu model çalışmaların hızlı ilerlemesiyle birlikte kritik genetik reaktiflerin oluşturulması açısından çok uygundur (Dooley ve Zon, 2000).

Zebra balığı, insanlara karşı yüksek bir genetik benzerlik paylaşmaktadır ve tüm insan hastalık genlerinin yaklaşık % 70'i, zebra balığı içerisinde işlevsel homologlara sahiptir. Zebra balığı biyolojisinin birçok avantajı onu araştırmacılar için çekici bir model haline getirmektedir. Bunlar: haftada 200–300 yumurta bırakabilen yüksek üreme verimine sahip canlılar olmaları, vücut dışında gelişen saydam embriyolara sahip olmaları ve hızlı gelişen olmalarıdır. Ek olarak, zebra balığı yetiştirmek ve bakımını yapmak kolay ve ucuzdur, böylece binlerce hayvanın laboratuvarında makul bir maliyette tutulmasını mümkün kılar (Santoriello ve Zon, 2012).

2.3. Zebra Balığının Genel Özellikleri

Zebra balığı (*Danio rerio*) Cyprinidae familyasında yer alır. Anavatanı Güneydoğu Asya olan zebra balıkları yoğun olarak Pakistan ve Hindistan'da iç sularda bulunmaktadır (Mills, 1986).

Genellikle durgun, temiz ve bol oksijenli sularda yaşarlar. Gövdelerinde 7-9 adet gümüş rengi ve mavi çizgiler vardır. Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede yaşayabilir. 18-30°C aralığında bir sorun olmadan hayatını sürdürebilmektedir. Zebra balıklarının üremeleri oldukça kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28°C'dir (Akbulut ve ark. 2000).

Ergin hale gelmemiş bireylerde eşey ayrımı yapmak çok zordur, fakat erginleşmemiş erkek bireylerin dişiye kıyasla anal yüzgeçlerinin daha büyük olması ve dişilerdeki genital papilla yapısı bu ayrımı kolaylaştıran noktalardır. Bunun yanı sıra dişilerde karın kısmı oldukça şişkin ve tombuldur (Şişman, 2007). Erkek bireyler dişi bireylerden morfolojik olarak farklılık göstermektedir. Erkek bireylerin anal yüzgeçleri dişi bireylere göre daha büyük ve genital papillaya sahiptirler (Timur, 2006).

Zebra balığının gelişimi, insanlar da dâhil olmak üzere daha yüksek omurgalıların embriyogenezine çok benzer ancak memelilerden farklı olarak şeffaf bir yumurta ile ovipar üreme göstermektedir (Wixon, 2000).

Zebra balığının gövdesi birbirini izleyen koyu mavi, gümüş beyazı çizgilerle süslü, narin bir yapıya sahiptir. Dişi birey erkek bireyden daha iri ve daha kıvrık karın çizgisine sahiptir. Ergin dönemde boyları 5 cm kadardır. Erkeklerde altın, dişide sarımsı beyaz ton üzerinde, parlak mavi boyuna bantlar vardır. Bantlar kuyruk yüzgecinin sonuna kadar devam eder. Anal yüzgeç de bantlıdır. Sırt kahverengimsi yeşil, karın beyazımsıdır. Sırt yüzgeci zeytin rengine, dış kenarları mavi-beyazdır. Çift yüzgeçleri renksizdir (Koç, 2008).

Balığın gövdesi ışığa bağlı olarak koyu mavi, gümüş beyazı veya altın sarısı çizgilerle örtülüdür (Mills, 1986).

Bir zebra balığı her üreme döneminde 50 ile 200 arasında yumurta bırakır. Bu da bir defada birçok denek üzerinde çalışma imkânı sağlamaktadır (Lieschke ve Currie, 2007). Yumurtalardan çıkan larvalar elverişli ortam şartlarında 3 ayda cinsel olgunluğa erişirler (Mills, 1994). Zebra balıkları durgun veya akıntılı sularda da yaşayabilirler. Aktif ve hareketli balıklardır.

Zebra balıkları omnivordur. Doğal yaşam alanlarında tercih ettikleri besin kaynakları arasında zooplanktonlar, böcekler, böcek larvaları, fitoplanktonlar, küçük kabuklular ve kurtçuklar bulunmaktadır (Smith ve ark, 2007). Zebra balıkları, embriyonal, juvenil, yetişkinlik aşamalarında; hayatta kalma, büyüme, gelişme, üreme, hastalıklara ve strese karşı direnç sağlamak için temel besin maddelerine ihtiyaç duyarlar. Bu besin maddeleri proteinler, aminoasitler, lipitler, karbonhidratlar, mineral ve vitaminlerdir. Bunun için doğal yaşam alanlarında en çok tercih ettikleri beslenme şekli canlı yiyeceklerdir. Artemia ve bazı rotiferler (*Brachionus sp.*) listenin en başında bulunur (Watanabe ve ark., 1983).

Balıklar ve insanlar, fizyolojik işlemlerde yer alan gen fonksiyonlarının benzerliğini paylaşır. Zebra balığı içindeki hastalığın modellenmesi, hastalık fenotipinin genetik veya kimyasal baskılayıcılarının veya arttırıcılarının tanımlanabileceği ve çalışılabileceği uygun ve güçlü bir platform sağlar. Zebra balığı, insan hastalık patogenezinin anlaşılmasında ve nihayetinde geniş bir hastalık yelpazesinde yeni terapötik ajanların keşfedilmesinde faydalı olacaktır (Santoriello ve Zon, 2012). Bu nedenle zebra balığı bilim dallarında en uygun denek modelleri arasında yer alır.

2.4. Balıklarda Gonad Yapısı

Gonadlar, omurgalıların embriyonik döneminde mesonefroz kanallar komşuluğunda taslaklar halinde gelişmeye başlar. Primordiyal germ hücreleri yumurta sarısı kesesi (yolk sac) endoderminin allontoise yakın olan bölgesinden ameboid hareketlerle primordiyal gonadlara (gonad taslakları) göç ederler. Eğer bu göç olmazsa gonadlar gelişmez ve sadece kabartı halinde kalır. Embriyonik gelişimin ilk evrelerinde gonadlar farklılaşmamıştır (farklılaşmamış gonad), ancak, genotipe uygun olarak erkek ya da dişi gonadı oluşturma yeteneğine sahiptir. Gonadlar, somatik ve germ hücre kümesinden oluşur. Germ hücreleri, gonad taslakların da uzak bölgelerde özelleşerek göç ederler. Bu evrede germ hücreleri primordiyal germ hücreleri (PGH) olarak isimlendirilir. Bunlar germ hücre soyunun (sperm ya da yumurta) öncü hücreleridir. Bu hücreler, embriyonik dönemde ortaya çıkan embriyonik kök hücrelerdir. (Koç, 2008).

Primordial germ hücreleri (PGC), gametlerin kurucu hücreleridir. Gelişimin en erken aşamalarında ortaya çıkarlar ve gelecekteki gonad'ın somatik hücrelerine katıldıkları genital sırtlara göç ederler. Oluşumunu ve göçünü belirleyen faktörler büyük ölçüde bilinmemektedir. Göçleri sırasında farklı zamanlarda izole edilen PGC'lerin birincil kültürü, davranışlarının kontrolünün bazı yönlerinin analizine olanak sağlamıştır. Genital sırtlarla şartlandırılmış kültür ortamının etkileri, PGC'lerin hem çoğalmasının hem de göçünün kısmen yayılabilir faktörlerle kontrol edilebileceğini göstermiştir (Wylie, 1993).

Gametler, primordiyal germ hücrelerinden gelişir. Bu hücreler, hem göç sırasında hem de gonadlarda mitoz bölünme ile sayılarını artırır ve gonadlarda gamet öncü hücrelerine farklılaşır. Gametlerin öncü olan bu hücrelerine erkeklerde spermatogonyum, dişilerde oogonium (oogonyum) denir. Bu hücreler, gametogenez (erkeklerde spermatogenez, dişilerde oogeneze) olayı ile gametleri meydana getirirken mayoz bölünme evresi geçirirler. Gelişmekte olan gametlerin sitoplazmalarında değişimler olur. Erkeklerde sperm (spermatozoon), dişilerde oosit oluşur. Sperm ve oosit, özelleşmiş üreme hücreleridir (Gürsoy ve Koptagel, 1997).

2.5. Zebra Balığının Ovaryum Histolojisi

Olgun haldeyken tanecikli görünüme sahip olan bir çift ovaryum dış taraftan periton ile çevrili ve oval şekillidir. Bu durumdaki bir ovaryumda yumurtalar, bağ dokusu ve kan damarları rahatlıkla görülebilmektedir (Çakıcı, 2001).

Yumurtalar yumurtalıkta oluşur. Genital bir açıklığa yol açan anüsün arka kısmında kısa bir lümen “yumurta kanalı” bulunur. Hassas olan yumurtalığın duvarında az miktarda düz kas vardır. İnce boyuna kıvrımlar ya da lameller olarak yayılan ve yumurtalık boşluğunun içine bağlanan bir bağ dokusu bölmesinin üzerinde bulunan epitel doku bulunur. Gelişimin farklı aşamalarında rastgele düzenlenmiş foliküller içerir. Atretik foliküller ve postoperatif foliküller yumurtalık içinde bulunurken her biri bir oosit içeren foliküller, somatik (germinal olmayan) hücrelerin katmanları ile sarıdır (Selman ve ark., 1993).

Yumurtalıklar çift ve uzun yapılardır. Ovaryum dokusu histolojik olarak incelendiğinde genellikle farklı gelişim evrelerinde oositlerin olduğu görülmektedir. Kısa bir yumurta kanalı, yumurtaları dışarıya doğru iletir (Menke ve ark. 2011). Kemikli balıklarda oositler, diğer omurgalılarda olduğu gibi, dış bir tabaka ve bir iç granüloza olarak iki ana hücre tabakası ile çevrilidir. Oositler büyüdükçe, folikül hücreleri çoğalır ve granüloza hücre tabakası adı verilen sürekli bir foliküler tabaka oluşturur. Balık oosit gelişimi, oosit büyümesi ve oosit olgunlaşmasına ayrılabilir. Vitellogenesis oosit büyümesinde önemli bir rol oynar. Germinal vezikül

göçü ve parçalanması, lipid damlacıklarının ve yumurta sarısı globüllerinin birleşmesi ve 1. polar gövdenin serbest bırakılması olgunlaşmanın önündeki karakteristik olaydır (Yön ve ark. 2008).

Kemikli balıkların çoğunda, oogenezi süreci beş, altı veya sekiz aşamaya ayrılabilir (Aytekin ve ark., 2008). Zebra balıklarında dört evre görülür. Oogenezi süresince değişen histolojik özellikler paralelinde; primer oosit evresi, kortikal-alveolar evre, vitellojenik evre ve olgunluk evresi olarak başlıca dört evre ayırt edilmiştir (Çakıcı, 2001).

2.5.1. Oosit olgunlaşması

Oosit büyümesini tanımlamak için çeşitli sınıflandırmalar önerilmiştir. Bu sınıflandırmalar, büyüyen oositin ve çekirdeğinin morfolojik özelliklerini, oosit boyutunu ve granülosa hücre tabakası özelliklerini hesaba katarak yapılır (Lambert, 1970; Selman ve ark., 1993). Oogonyum germinal epitel dokulardan oluşur. Oogonyumların bir kısmı primer oositlere dönüşür (Lambert, 1970).

Gonadlar gelişim sırasında oositler yavaş yavaş yumurta sarısı globülleri (yuvar) üretir ve hücre hacmi artar, çekirdek hücre çevresine doğru hareket eder ve mikropil oluşur. Foliküler hücreler hücre dışı matris reorganizasyonu ile moleküler değişikliklere uğrar ve teka görünür (Viana ve ark., 2018).

2.5.1.1. Primer oosit evresi

Oosit gelişiminin ilk basamağı primer oosit evresi olarak adlandırılır. Bu evrenin başlangıcında oositler fizyolojik olarak küreseldir. Oositlerde ooplazma yoğun olarak bulunur. Çekirdekli veya çekirdeksiz bulunabilirler. Oositler genişledikçe, nükleollerin çevresi olarak yönlendirilmiş bir çizgi oluşturulduğu kolaylıkla anlaşılabilmektedir (Çakıcı ve Üçüncü 2007).

2.5.1.2. Kortikal alveolar evre

Kortikal-alveolar evre oosit gelişiminin ikinci adımıdır. Oositlerin çapı artarken, ilk olarak ooplazmanın periferel bölgesinde kortikal alveoller ortaya çıkar. Çekirdekler düzensiz şekildedir. Nükleusların çoğu nükleer membranın iç sınırına bağlanır (Çakıcı ve Üçüncü 2007).

2.5.1.3. Previtellogenik evre

Bu evrede hücre büyüklüğü ve hücre çapında büyüme olur. Sitoplazmanın hacminde de artış olur. Germinal vezikül büyüklüğünde artış olur. Folikül hücreleri tek sıra halinde dizilir (Çakıcı, 2001).

2.5.1.4. Vitellogenik evre

Çoğu hayvanların oositlerinde olduğu gibi vitellüs çok önemli bir yapı elemanıdır. Vitellüsün birikimine paralel olarak oosit çapları çarpıcı bir biçimde büyür (Nagahama, 1983).

Vitellogenik evrede oosit büyüklüğünde artış olur. Bu artışının nedeni sitoplazmada organel artışıdır. Bu organeller, endojen ve eksojen olarak üretilir. Bunlar yoğun olarak golgi cisimciği ve endoplazmik retikulumdur. Golgi cisimciği ürettiği besinleri paketler. Besinler üretilip paketlenirken kortikal alveoller periferel doğru kaydırılır (Anderson, 1968). Bu evrede folikuler tabaka kalınlaşır ve en belirgin olan zona radiatadır (Çakıcı ve ark., 2007).

2.5.1.5. Olgunlaşma evresi

Vitellogenezis ilerledikçe olgun yumurtaların sitoplazmasının büyük bir kısmı, etrafları bir zar ile çevrelenmiş çok sayıdaki yoğun vitellüs granülleri ile doldurulmuş duruma gelir (Nagahama, 1983).

Vitellus kesesinin dolmasıyla ooplazmanın kapladığı alan daralır. Olgun yumurta sayısı artar. Bu nedenle oosit tabakaları düzensiz katlanır. Oositleri koruyan tabakanın yırtılması sonucunda yumurtlama meydana gelir (Çakıcı ve ark 2007).

Mayoz bölünme bu evrenin sonunda fertilizasyonun oluşması ile tamamlanır. Bu evrede hücre çapı artar. Granülosa tabakası incelir. Zona radiatanın kalınlığı azalır.



BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Zebra balığı

Çalışmada, SAÜ Biyoloji Bölümü Balık Yetiştirme Laboratuvarı'ndan zebra balıkları temin edildi. Deney için özel olarak 10x20x35 cm büyüklüğünde ve 5,5 litrelik akvaryumlar hazırlandı. Deney aşamasına geçilmeden önce balıklar 1 hafta boyunca gözlem altında tutuldu. Deney için özel olarak hazırlanan akvaryumlara 48 saat dinlendirilmiş su konuldu. Akvaryum içerisindeki sular, hava motorları ile oksijenlendirildi. Balıkların, deney süresince 28°C su sıcaklığında ve 14 saat aydınlık: 10 saat karanlık ışık periyodunda yaşaması sağlandı. Balıklar sabah ve akşam düzenli olarak Tetra Pro Energy yem ile beslendi.

3.1.2. N-Etil-N-Nitrozüre

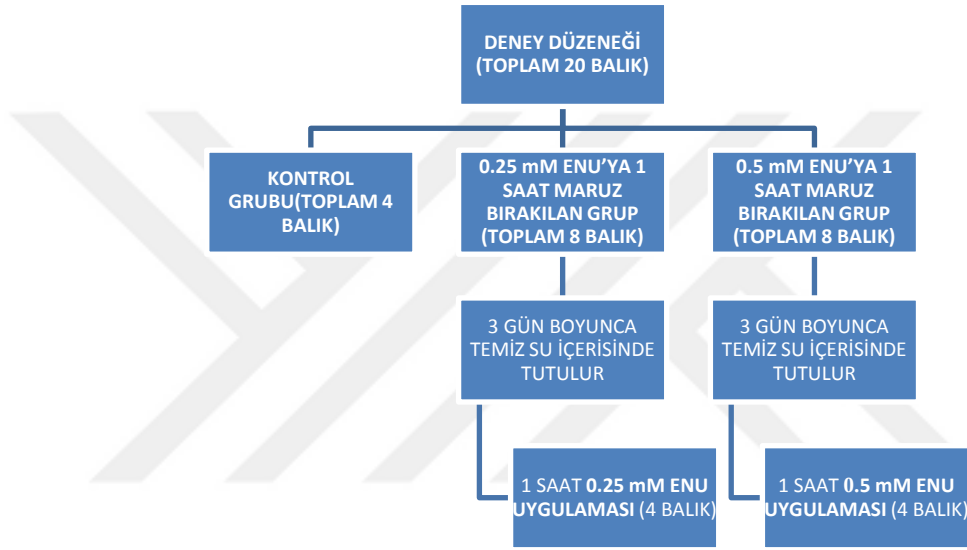
Çalışmada kullanılan kimyasal madde olan N-Etil-N-Nitrozüre (ENU) (CAS No: 759-73-9), Sigma Aldrich (St. Louis, MO)'den satın alındı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Deney düzeneği

Deney kapsamında 1 kontrol ve 4 deney grubu olmak üzere toplam 5 grup oluşturuldu. Her grupta 4'er dişi zebra balığı olmak üzere toplamda 20 dişi zebra balığı kullanıldı. İki grup 0.25 mMlik ENU maddesine bir saat maruz bırakıldı daha sonra temiz akvaryumlara dinlendirilmek üzere alındı.

Diğer iki grupta 0.50 mM’lik ENU maddesine bir saat maruz bırakıldı ardından temiz akvaryuma dinlendirilmek üzere alındı. Tüm gruplar üç gün temiz akvaryumlarda dinlendirildi. ENU maddesine bir saat maruz bırakılan 0.25 mM’lik iki gruptan biri üç gün dinlendirildikten sonra 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 kaldı. Aynı şekilde 0,50 mM olan doz grubun da bu yöntem uygulandı. Tüm balıklar beşinci gün diseksiyon işlemine tabi tutuldu (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Deney düzeneği

Deneyimiz bu düzenek şekli kullanılarak üç defa tekrarlandı. Kontrol ve deney grubuna ait ovaryumlar disekte edildikten sonra rutin histolojik işlemler uygulandı.

3.2.2. Histolojik analizler

3.2.2.1. Fiksasyon

Alınan doku örnekleri Bouin fiksatifinde 18 saat boyunca fikse (tespit) edildi. Çalışmamızda fiksatif olarak Bouin kullanıldı (Tablo 3.2.) .

Tablo 3.2. Bouin solüsyonunun hazırlanışı

Kullanılan maddeler	Miktarı	Süresi
Distile suda doyurulmuş pikrik asit	75 mL	2saat-24 saat
% 40'lık formalin	25mL	
Asetik asit	5mL	

3.2.2.2. Dehidrasyon

Fiksasyon işleminin ardından dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek içerisindeki su uzaklaştırıldı.(Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. Işık mikroskobu için dehidratasyon uygulaması

Kullanılan maddeler	Miktarı	Süresi
%50 Etanol	100 ml	30 dakika
%70 Etanol	100 ml	30 dakika
%80 Etanol	100 ml	30 dakika
%90 Etanol	100 ml	30 dakika
%95 Etanol	100 ml	30 dakika
%100 Etanol	100 ml	30 dakika
%100 Etanol	100 ml	30 dakika

3.2.2.3. Şeffaflaştırma

Hazırlanan zebra balığı ovaryum dokuları parafin çözücü sıvı olan ksilolde bekletilerek şeffaflaştırma işlemi uygulandı. Böylelikle dokudaki alkol dokudan uzaklaştırılmış oldu.

3.2.2.4. Parafine gömme ve blok hazırlama

Ksilol uygulamasından sonra dokular 58-60 c'lik etüvde parafin içinde bekletildi. 1 gece süren bu işlemden sonra dokular parafin içine gömüldü.

3.2.2.5. Kesit alma

Parafine gömülen ovaryum dokusundan Leica marka döner mikrotom kullanılarak yaklaşık olarak 5 mikron boyutunda kesitler alındı. Alınan kesitler albümin mayerli lamlara alındı ve boyanma işlemine geçildi.

3.2.3. Boyama

3.2.3.1. Hematoksilen-Eosin boyama metodu

Dokular rutin histolojik boya olan hematoksilen-eozin ile boyandı. (Tablo 3.4).

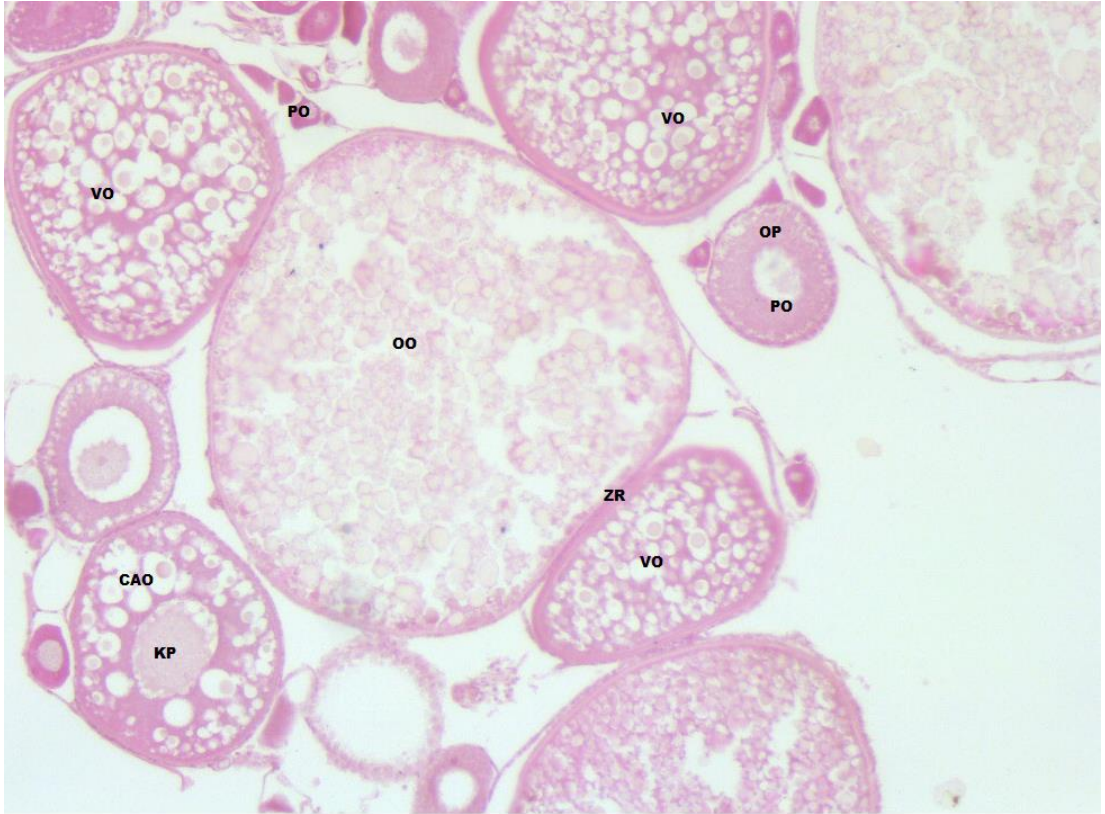
Tablo 3.4. Işık mikroskobu için Harris Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi

Ksilol	3x3 dakika
%70'lik Etanol	30 saniye
%80'lik Etanol	30 saniye
%90'lık Etanol	30 saniye
%100'lük Etanol	1x3 dakika
Akan musluk suyu	30 saniye
Hematoksilen	4,5 dakika
Distile suda	4 dakika
%95'lik Etanol	2x30 saniye
Eosinde	30 saniye
%100'lük Etanol	6x15 saniye
Ksilol	3x15 saniye
Entellan kapatılır.	

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubunda primer oositler büyük çekirdekli ve yuvarlak bir şekile sahipti. Primer oositlerde kortikal alveoller gözlenmedi. Zona radiata da bu safhada görülmedi. Kortikal alveolar oositte ooplazma periferinden başlayarak kortikal alveolların sayısında artış olduğu görüldü. Hücre çekirdekleri oosit merkezinde görüldü (Şekil 4.1.).

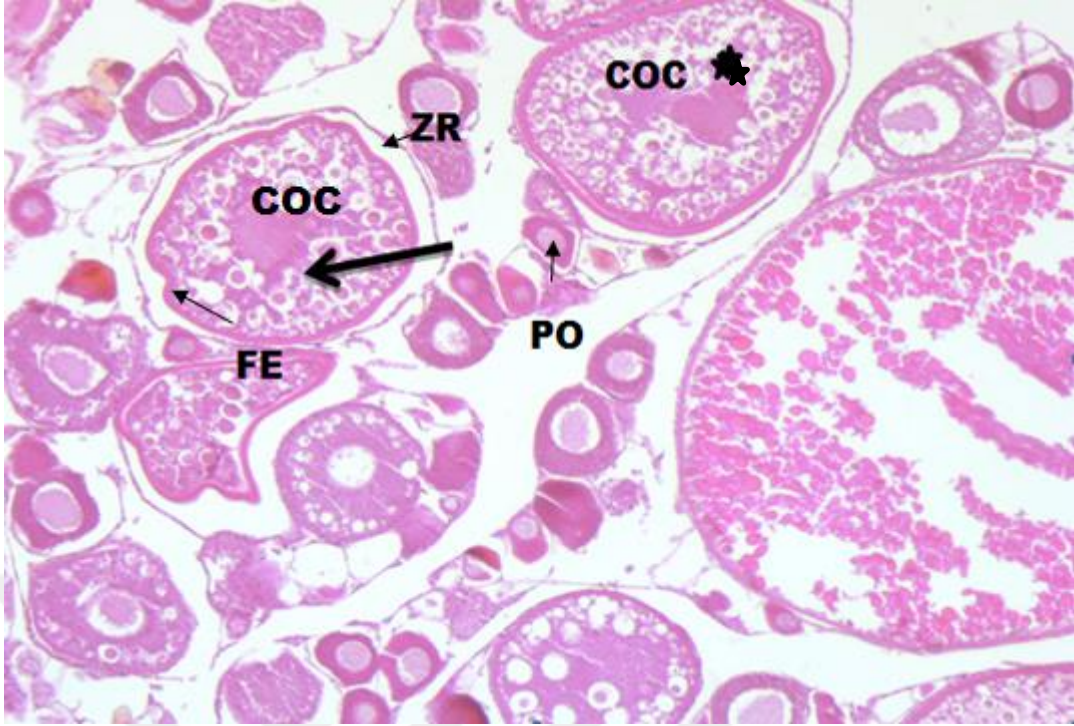


Şekil 4.1. Kontrol grubu; ovaryum dokusu içinde yer alan oositler; Primer oosit (PO), Vitellojenik oosit (VO), Ooplazma (OP), Karyoplazma (KP), Zona radiata (ZR), Kortikal Alveolar oosit(CAO), Olgun oosit(OO), H&E Boyama, X40

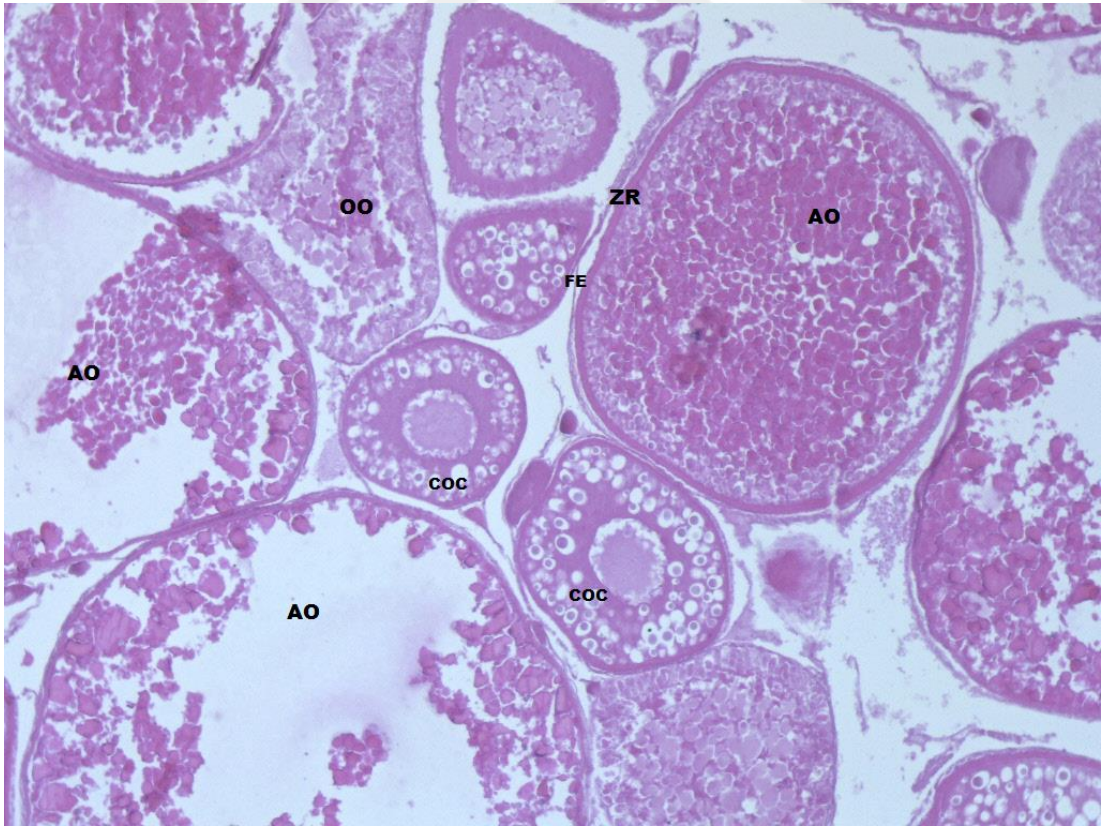
4.2. ENU Maddesi ile Bir Saat Maruz Kalan Dozlar

4.2.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup

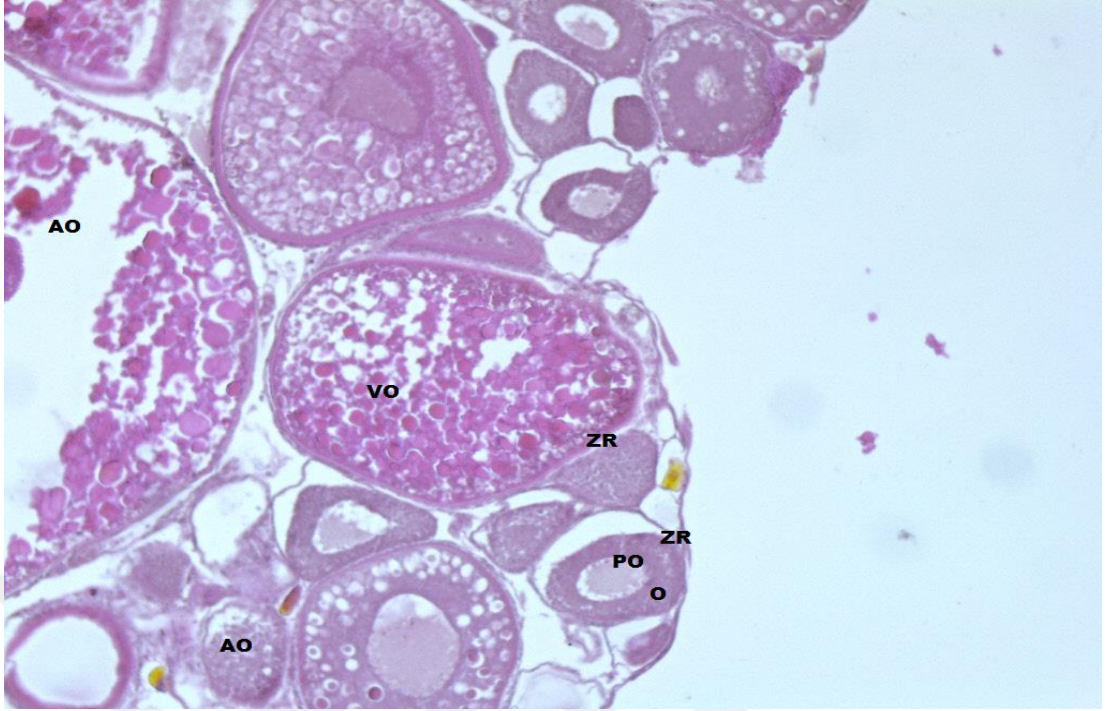
0,25 Mm ENU uygulanmış deney grubunda yapısal bozulmaya uğramış oosit gözlemlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kortikal alveol oositte şeklinde düzensizlik ve çekirdek kaymaları gözlemlendi. Ayrıca kortikal alveol oositte ooplazmasında vakuolizasyon gözlemlendi. Vitellojenik oositlerde nükleusların periferde doğru kaymalar izlendi. Zona radiata ile folikül epiteli arasında ayrılma gözlemlendi. Primer oositler diğer gruplardaki primer oositler ile karşılaştırıldığında sayısı daha çok olduğu gözlemlendi. Primer oositlerde nükleoplazmalarında büzülme izlendi (Şekil 4.2.). Kontrol grubu ile kıyaslandığında zebra balıklarının bir saat 0.25 mM ENU ya maruz kalmaları sonucunda ovaryum dokusunda bağ dokusu artışı gözlemlendi. Ayrıca atretik oositler görüldü. Vitellojenik oositlerde ooplazmada vakuolizasyon gözlemlendi. Ayrıca zona radiata ile folikül epiteli arasında açılmalar gözlemlendi. Kortikal alveolar oositte nükleoplazmada büzülme gözlemlendi. Olgun oositlerde yapısal bozulmalar gözlemlendi (Şekil 4.3.). Primer oositlerde ooplazma ile zona radiata arasında açılmalar gözlemlendi. Vitellojenik oositlerin iç bölgelerinde vakuolizasyonlar gözlemlendi. Atretik oositler izlendi. Olgun oositlerde yapısal bozulmalar ve ooplazmasında vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 4.4.). Olgun oositlerde zona radiata kalınlaşması gözlemlendi. Ayrıca zona radiatada parçalanmalar gözlemlendi (Şekil 4.5.).



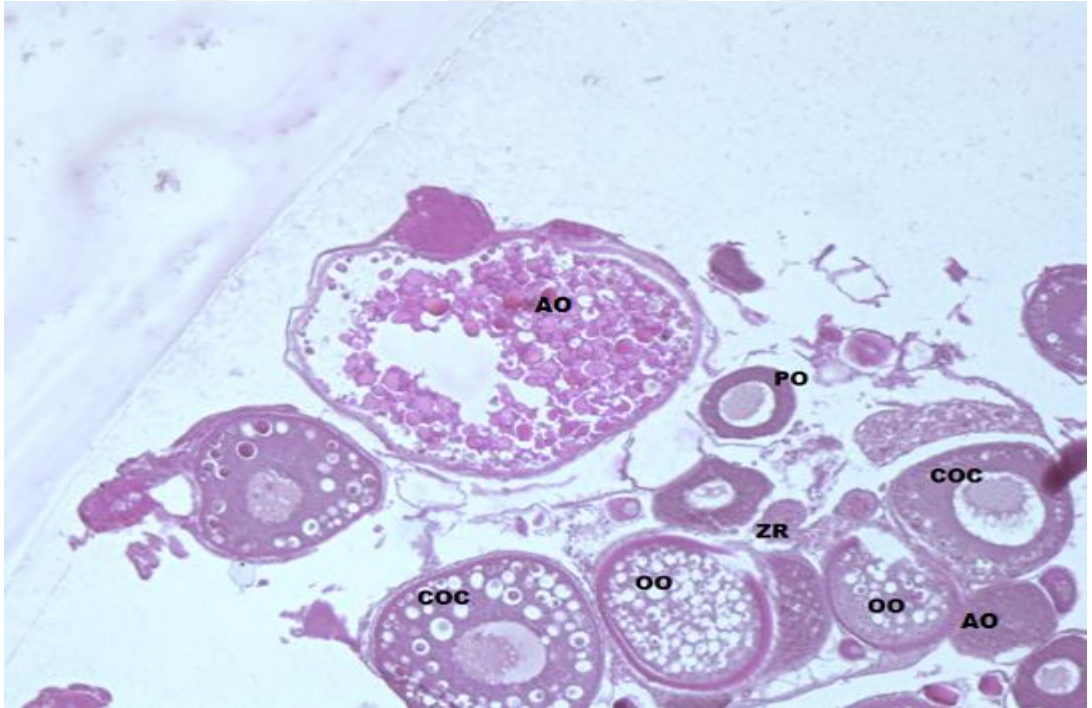
Şekil 4.2. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, kortikal alveol oositte şekil bozukluğu (ok), nükleusta perifere kayma (yıldız), COC-kortikal alveol oosit, ZR-zona radiata, FE-folikül epiteli Hematoksilen&Eosin, X10.



Şekil 4.3. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu,, Atretik oosit (AO), kortikal alveol oosit (COC), Olgun oositler (OO), Zona radiata (ZR), Folikül epiteli (FE) Hematoksilen&Eosin, X40



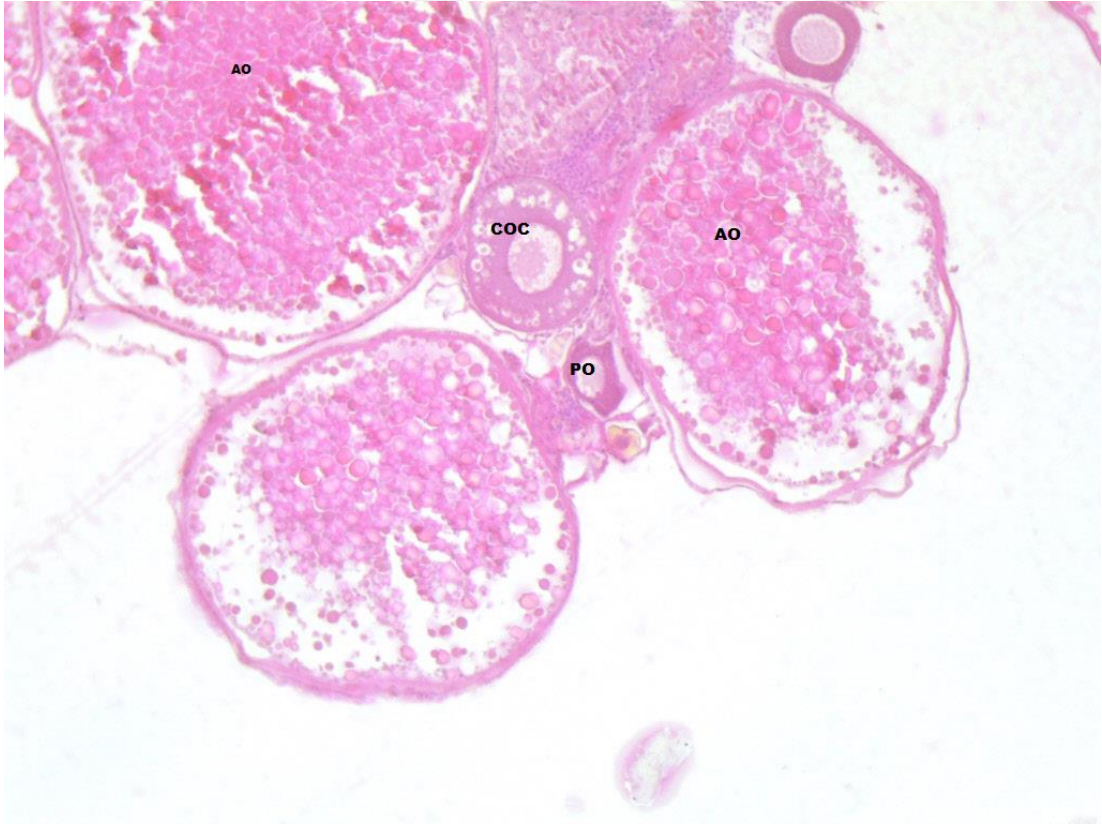
Şekil 4.4. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Primer oosit (PO), Atretik oosit (AO) zona radiata(ZR), Ooplazma (O)Hematoksilen&Eosin, X40



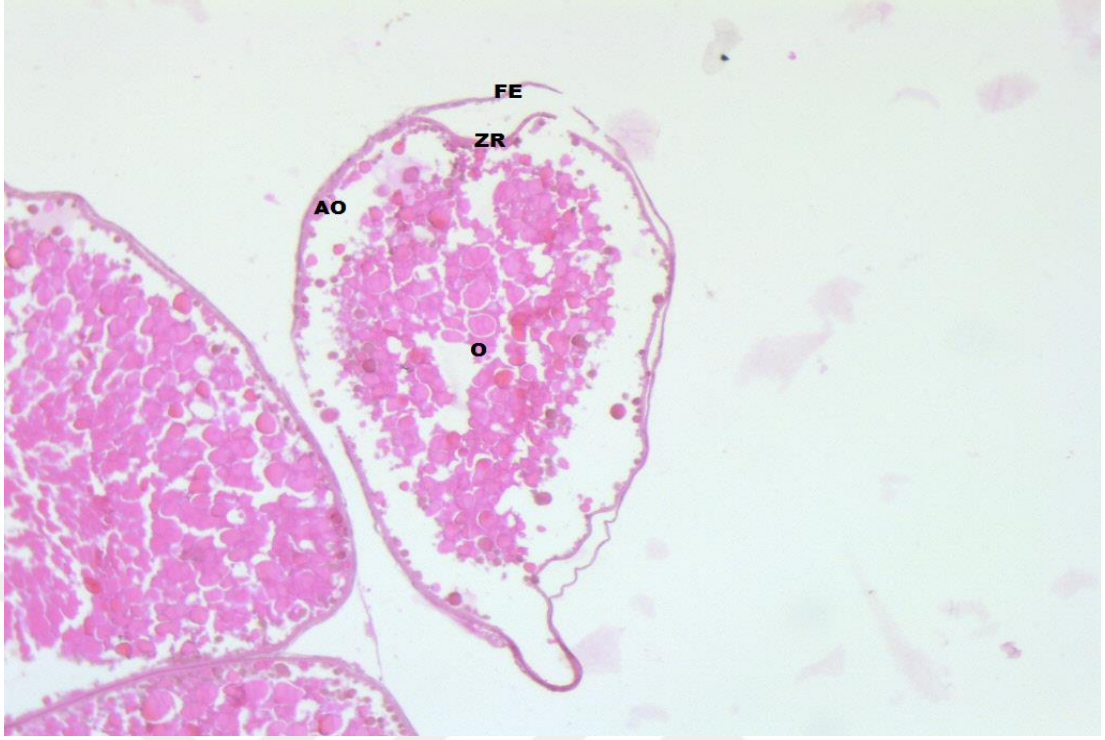
Şekil 4.5. 0,25 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Primer oosit(PO), kortikal alveol oosit (COC), olgun oosit (OO), zona radiata(ZR), Hematoksilen&Eosin, X40

4.2.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup

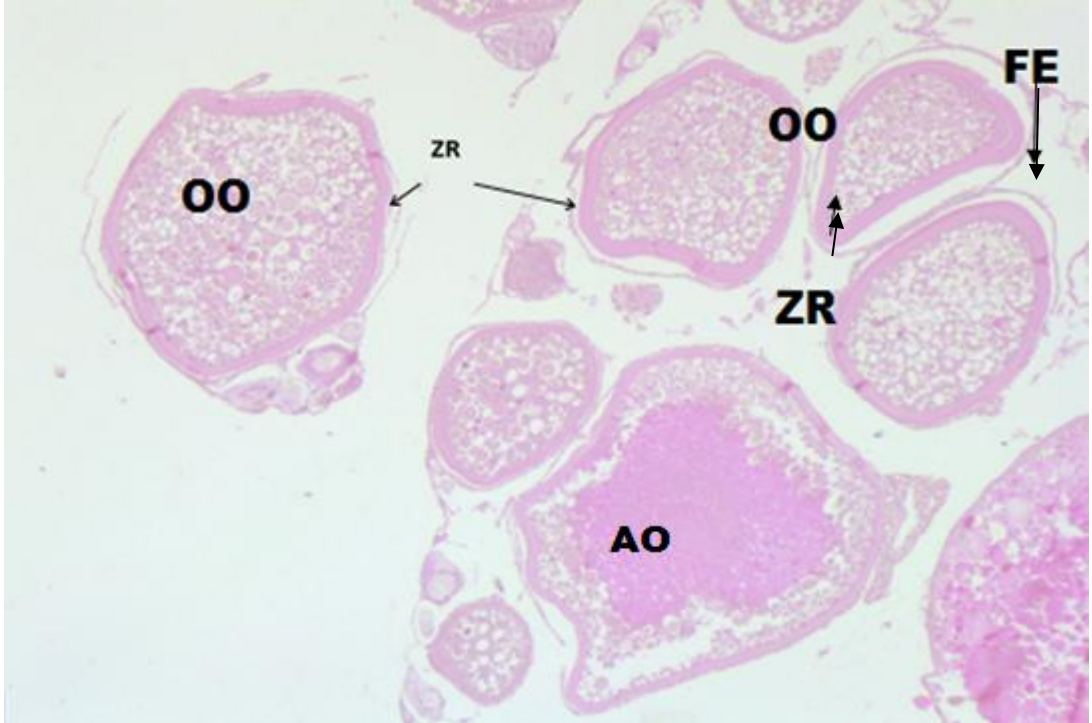
Kontrol grubunda incelenen bağ doku miktarına göre 0,50 mM'lik doz grubunda bağ dokusu düzeyinde artış gözlemlendi. Ayrıca atretik oositlerde sayıca artış görüldü. Primer oositlerde azalma görüldü (Şekil 4.6.). Olgun oositlerde deformasyon olduğu gözlemlendi. Olgun oosit yapısında şekil bozukluğu izlendi. Olgun oosit ooplazmada yapısal bütünlüğün bozulduğu görüldü. Olgun oositlerde zona radiata ile folikül epiteli arasında açıklık gözlemlendi. Olgun oosit ooplazmasında bütünlüğünde bozulmalar gözlemlendi (Şekil 4.7.). Olgun oositlerde kontrol grubuna oranla zona radiata da kalınlaşmalar gözlemlendi (Şekil 4.8.). Primer oositlerde ooplazma ile zona radiata arasında açılmalar gözlemlendi. Olgun oositlerde zona radiatada kalınlaşmalar gözlemlendi. Primer oositlerde nükleoplazmada büzülme meydana geldiği izlendi (Şekil 4.9.). Primer oositlerin deforme olduğu, gelişen oosit yapılarının bozulduğu, olgun oositlerin atretik forma dönüştüğü görüldü.



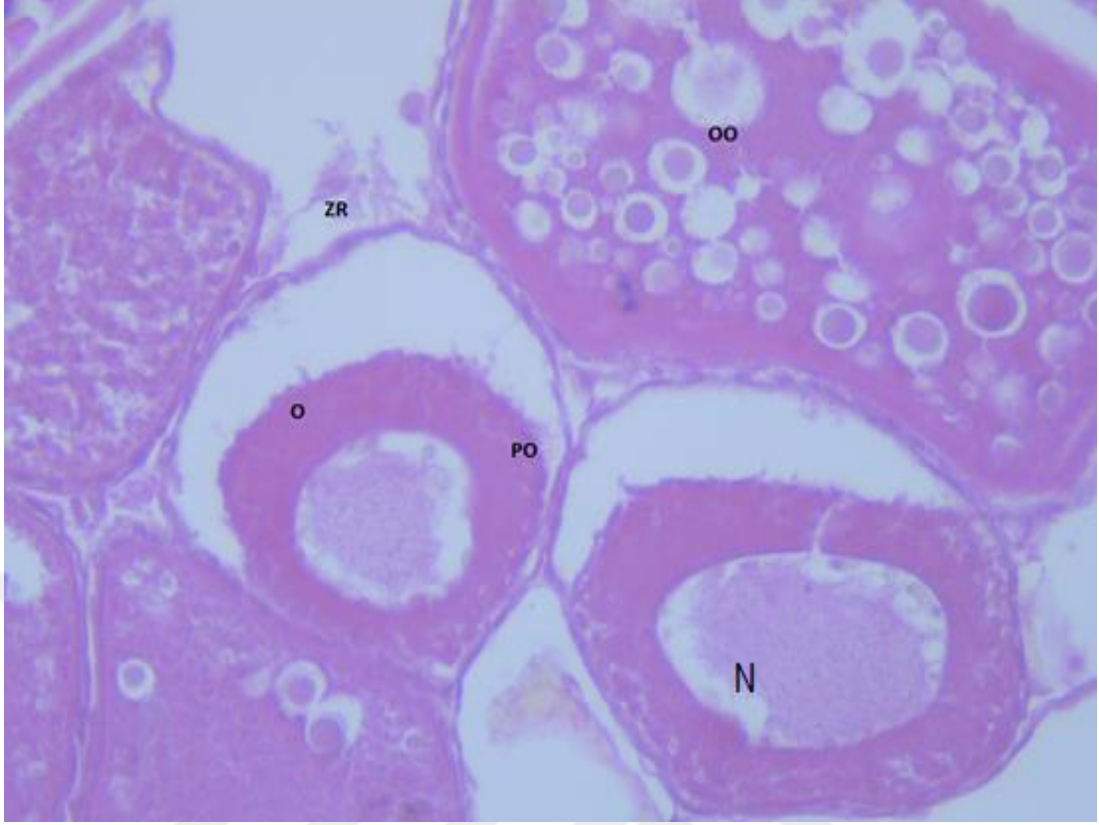
Şekil 4.6. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Kortikal alveol oosit (COC), Atretik oosit (AO), primer oosit (PO), Hematoksilen&Eosin, X10



Şekil 4.7. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Atretik oosit (AO), zona radiata (ZR), ooplazma (O), Folikül Epiteli (FE), Hematoksilen&Eosin, X40



Şekil 4.8. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Zona radiata(ZR). Atretik oosit (AO), Olgun oosit (OO), Folikül Epiteli (FE), Hematoksilen&Eosin, X40



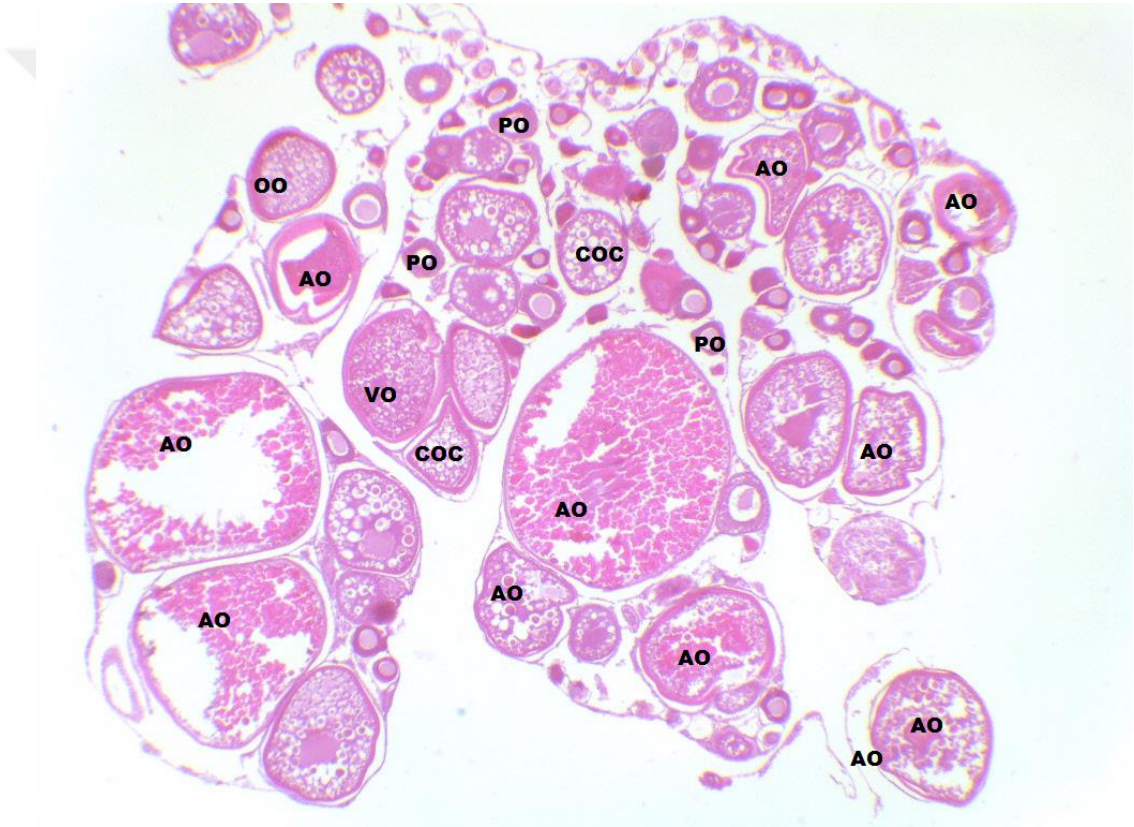
Şekil 4.9. 0,50 mM ENU ya bir saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, ZR-Zona radiata, O-Ooplazma (O), olgun oosit (OO), primer oosit (PO), nukleoplazma (N) Hematoksilen&Eosin, X100

4.3. ENU Maddesi İki Saat Maruz Kalan Dozlar

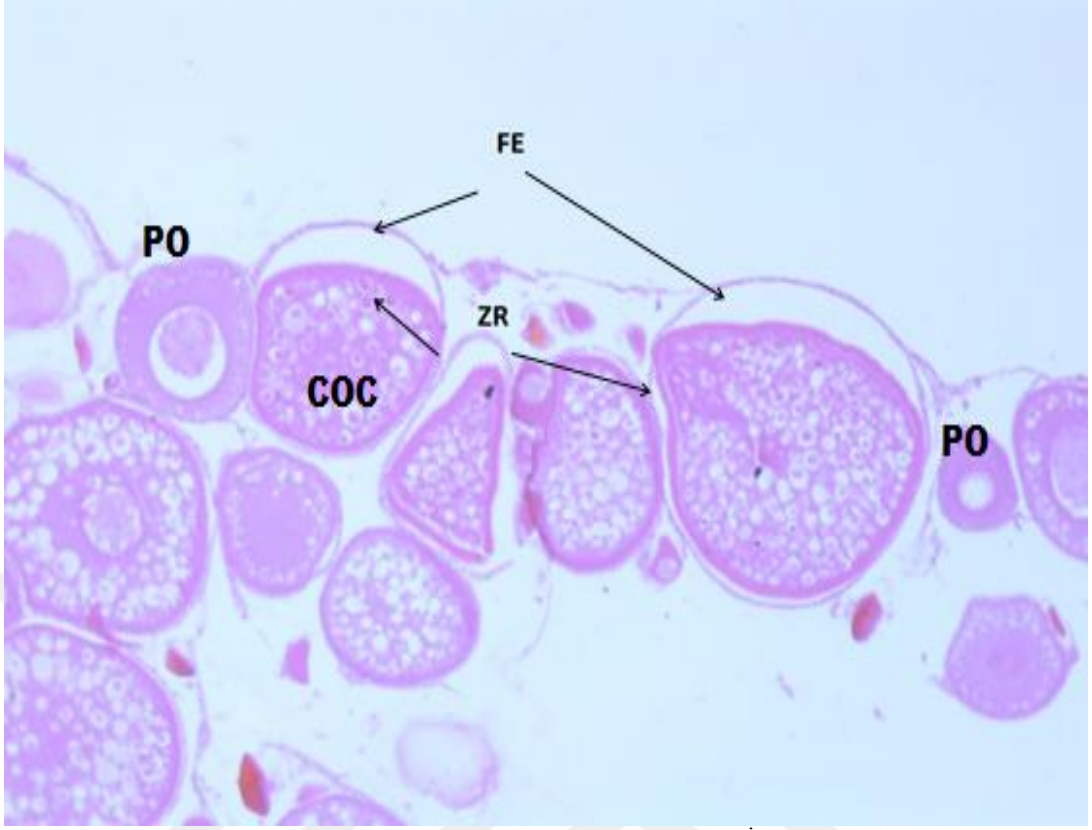
4.3.1. 0,25 mM ENU maddesi uygulanan grup

İki saat 0,25 mM ENU'ya maruz kalmış deney grubunda bir saat 0,25 mM maruz kalan oositlere göre gelişen oosit sayısında gözle görünür şekilde azalma olduğu izlendi (Şekil 4.10.). Bir saatlik 0,25 mM'lik doz grubunda olduğu gibi bu grupta da Kortikal alveol oositte zona radiata ile folikül epiteli arasında açılmalar gözlemlendi. Primer oositlerde nükleoplazmada büzölmeler gözlemlendi (Şekil 4.11.). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta olgun oositlerde ooplazmada büzölmeler gözlemlendi. Olgun oositte zona radiata belirgin bir düzeyde kalınlaşma gözlemlendi. Ayrıca olgun oosit sınırında kıvrılmalar gözlemlendi. Primer oositin nükleoplazmasında büzölmeler gözlemlendi. Kortikal alveoler oositte zona radiatada kalınlaşmalar gözlemlendi. Ayrıca kortikal alveollerde bozulmalar oldu. Kortikal alveoler oositin çekirdek yapısında

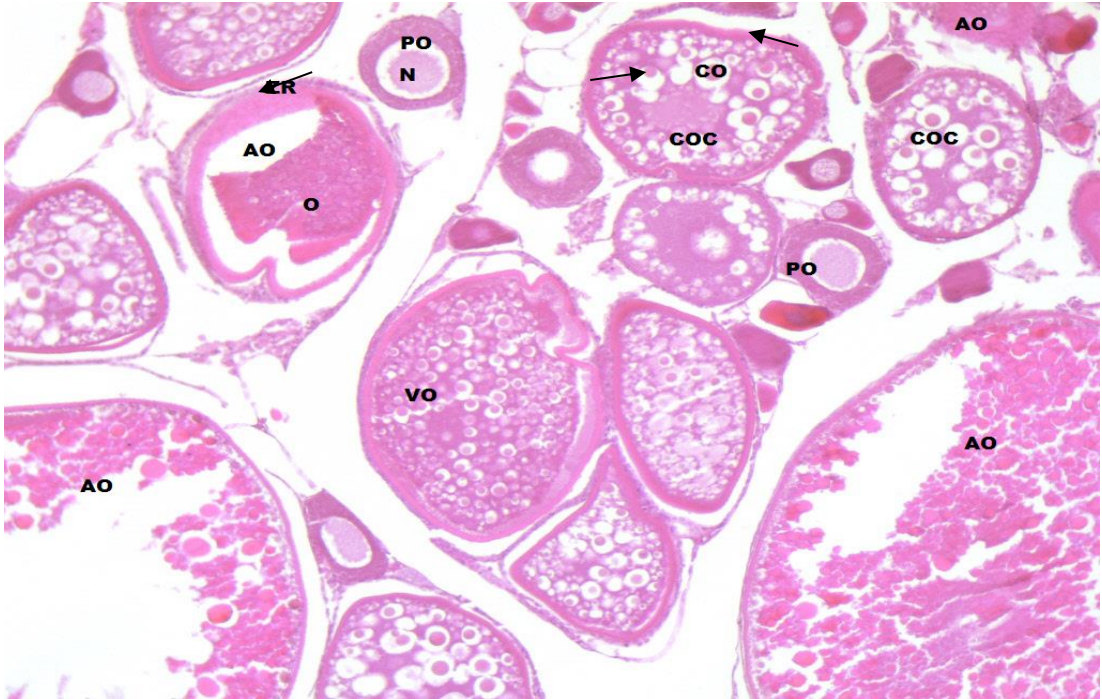
deformeler gözlemlendi. Vitellojenik oositlerde zona radiata da kalınlaşmalar gözlemlendi ve folikül epitel ile zona radiata arasında açılmalar gözlemlendi. Ayrıca atretik oositler gözlemlendi (Şekil 4.12.). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 0,25 mM ENU doz grubundaki kortikal alveolar oosit dejenere olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13.). Bağ doku oranında artış gözlemlendi. Bir saat 0,25 mM maruz kalan oositlere göre atretik oosit sayısında artış gözlemlendi. Vitellojenik oosit ooplazmasında vakuolizasyonlar gözlemlendi. Ayrıca bazı vitellojenik oosit yapısındaki zona radiatada kalınlaşmalar gözlemlendi (Şekil 4.14.).



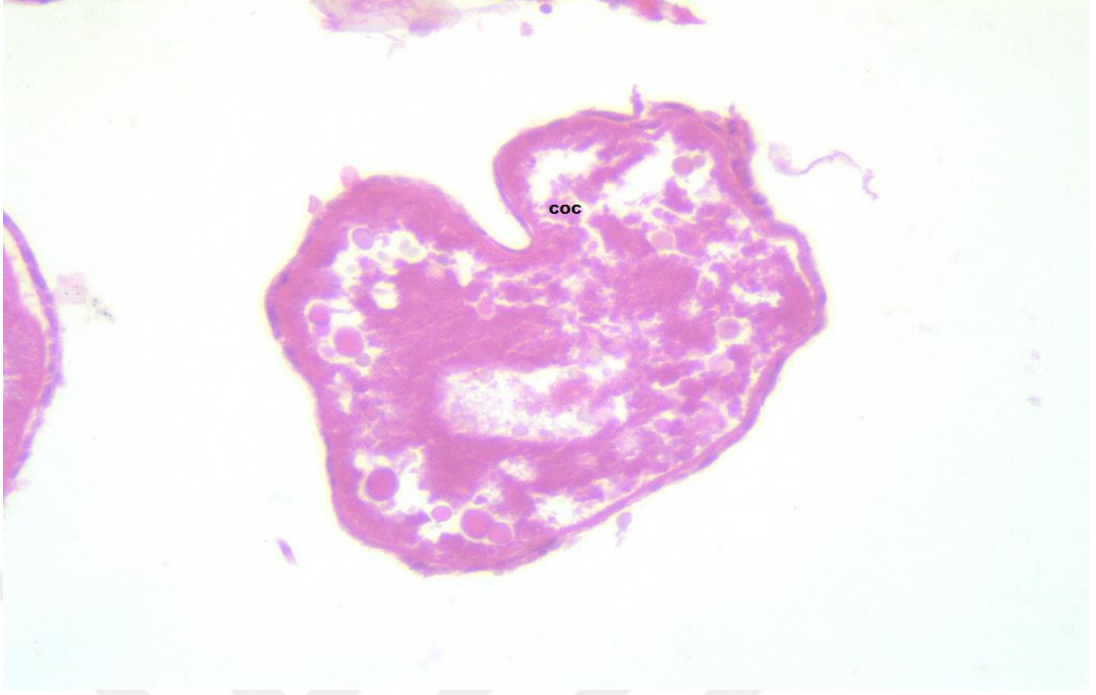
Şekil 4.10. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan zebra balığı ovaryumu, Atretik oosit (AO), Primer oosit (PO), kortikal alveolar oosit (COC), vitellojenik oosit (VO), olgun oosit (OO), Hematoksilen&Eosin, X10



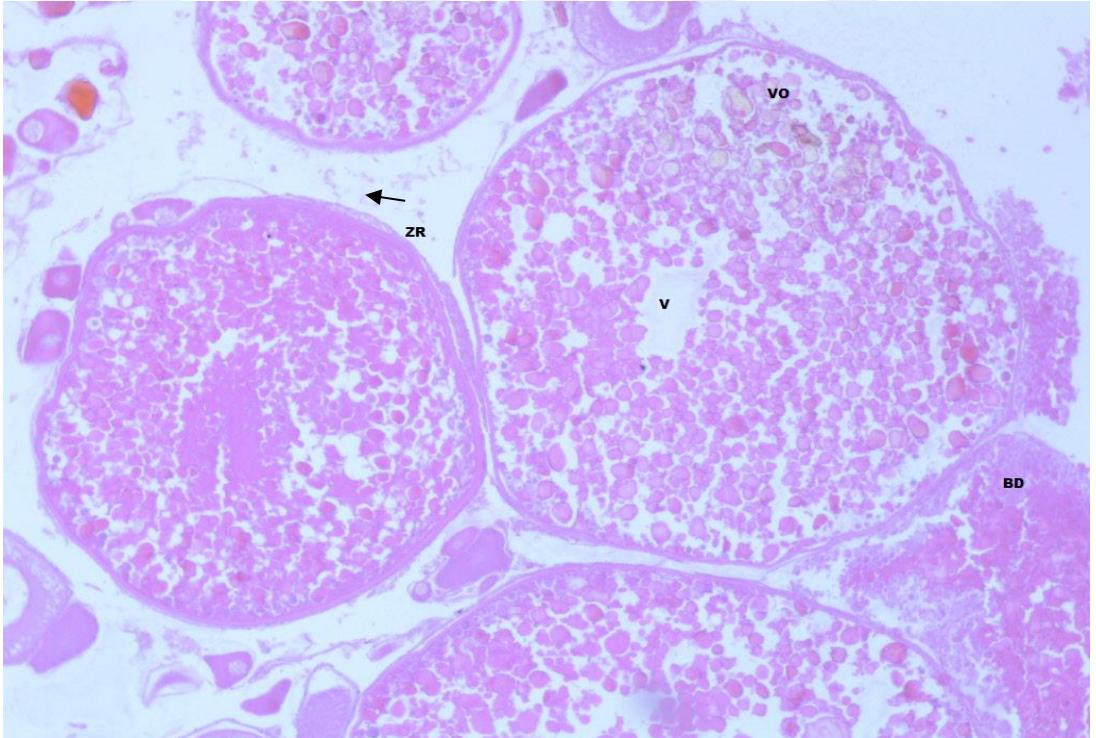
Şekil 4.11. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, follikül epiteli(FE), zona radiata(ZR), Kortikal alveol oosit (COC), Primer oosit (PO) Hematoksilen&Eosin, X40



Şekil 4.12. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, zona radiata (ZR). Vitellojenik oosit VO), atretik oosit (AO), primer oosit (PO), ooplazma (O), Olgun oosit(OO), kortikal alveol oosit(COC), nükleoplazma (N), kortikal alveol(CO), Hematoksilen&Eosin, X40



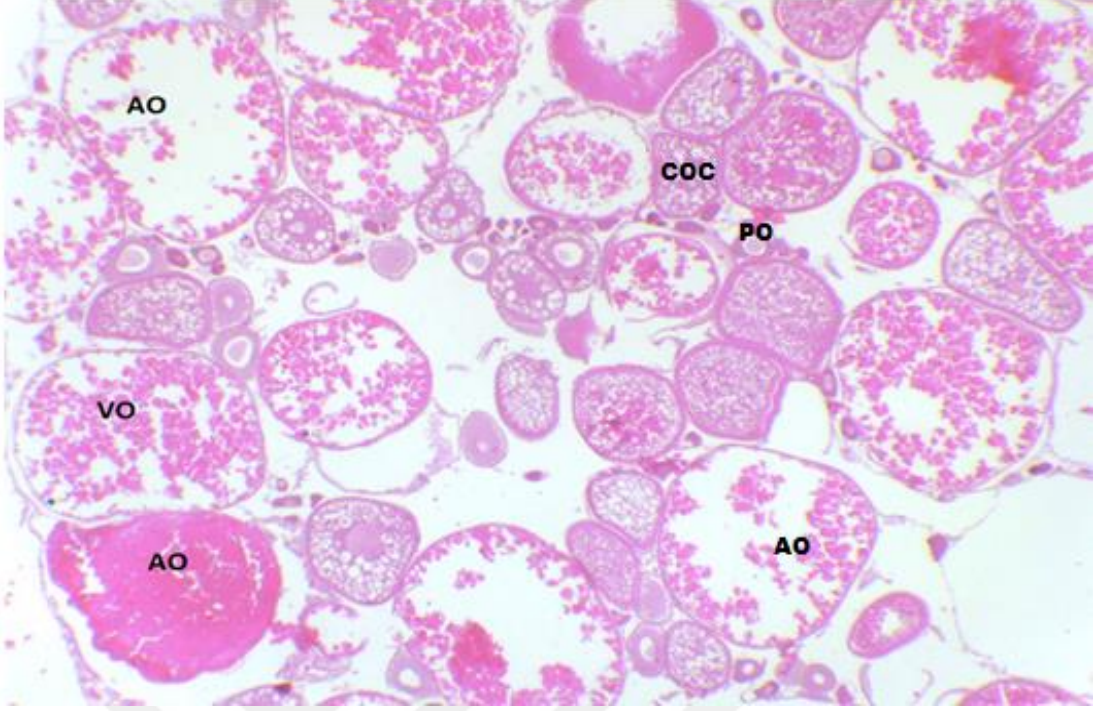
Şekil 4.13. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Kortikal alveoler oosit (COC), Hematoksilen&Eosin, X100



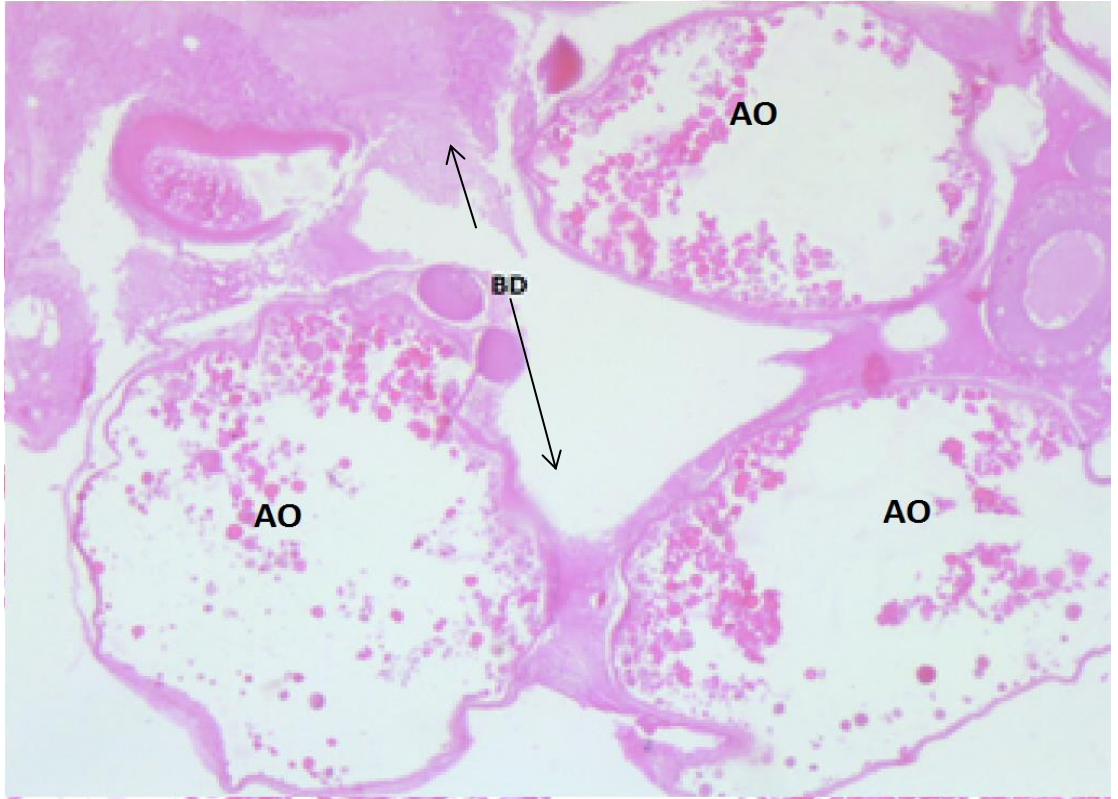
Şekil 4.14. 0,25 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Bağ doku (BD), vitellojenik oosit (VO), ooplazma (O), Hematoksilen&Eosin, X100.

4.3.2. 0,50 mM ENU maddesi uygulanan grup

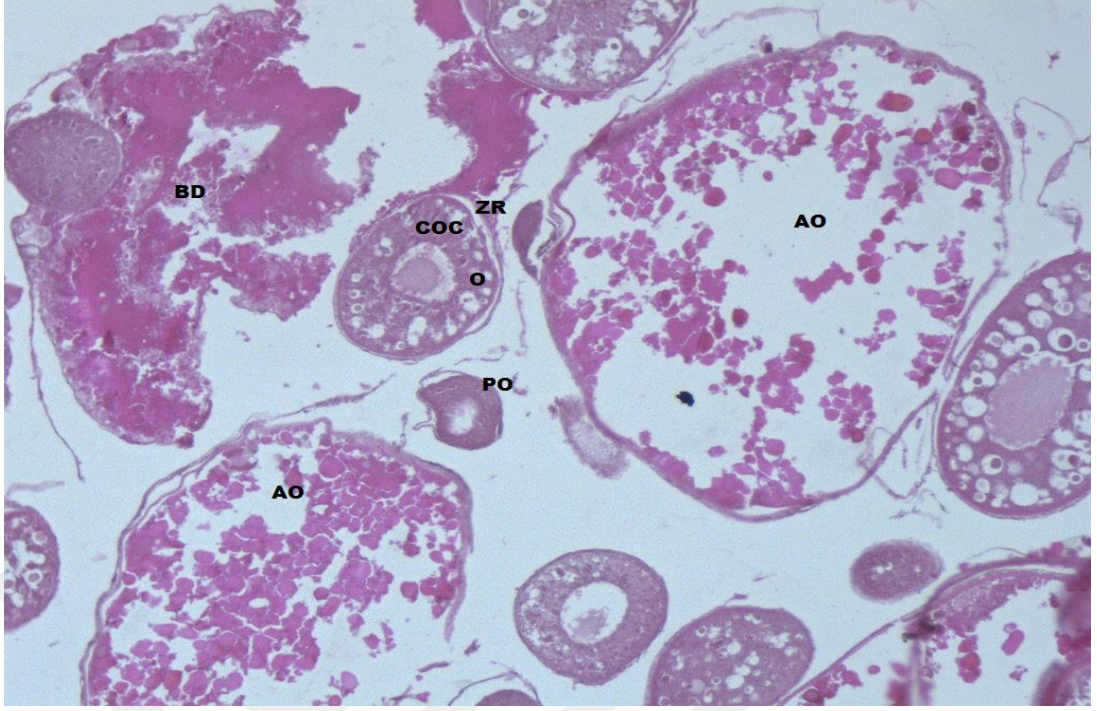
0,50 mM ENU uygulanan grup diğer doz grupları ile kıyaslandığında bu doz grubundaki vitellojenik oositlerin birçoğu atretik oosit olarak izlendi. Kortikal alveolar ve atretik oosit sayısında artış gözlemlendi (Şekil 4.15.). Bir saatlik 0,25 mM ve 0,50 mM ile iki saatlik 0,25 mM göre bağ doku artışı bu grupta daha fazla miktarda gözlemlendi (Şekil 4.16.). Bir saatlik 0,50 mM doz grubuna göre atretik oosit sayısında artış gözlemlendi. Kortikal alveolar oositte zona raddita ile ooplazma arasında açılma gözlemlendi. Primer oositte vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 4.17.). Bir saatlik 0,50 mM ENU da gözlemlendiği gibi bu grupta da folikül epiteli ile zona radiata arasında açılmalar gözlemlendi. Ayrıca bir saatlik 0,50 mM ENU'ya oranla iki saatlik 0,50 mM'lik ENU doz grubunda deformasyona uğramış vitellojenik oosit sayısının belirgin olarak arttığı görüldü. Vitellojenik oositte yapısal bozulmaya uğramış yani deformasyona uğradığı gözlemlendi. Vitellojenik oositte ooplazma ile zona radiata arasında açılma gözlemlendi. Ayrıca vitellojenik oositte zona radiata kalınlaşması gözlemlendi. Gelişen oositler yani primer oosit ve kortikal alveolar oosit sayılarında azalma gözlemlendi. Primer oositlerde yapısal deformasyonlar gözlemlendi (Şekil 4.18.). Bir saatlik 0,50 mM'lik ENU doz grubuna kıyasla iki saatlik 0,50 mM ENU doz grubunda vitellojenik oositlerde zona radiata da belirgin düzeyde kalınlaşma gözlemlendi (Şekil 4.19.).



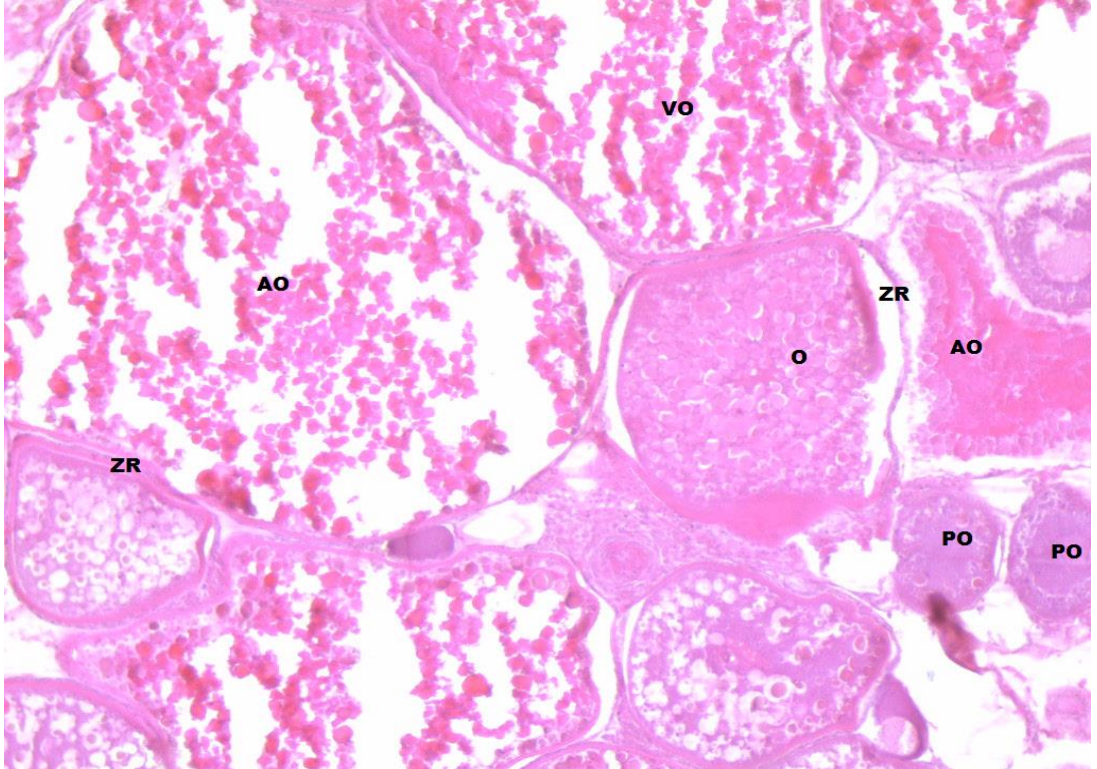
Şekil 4.15. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, atretik oosit (AO), vitellojenik oosit (VO), kortikal alveoler oosit(COC), Primer oosit(PO), Hematoksilen&Eosin, X10



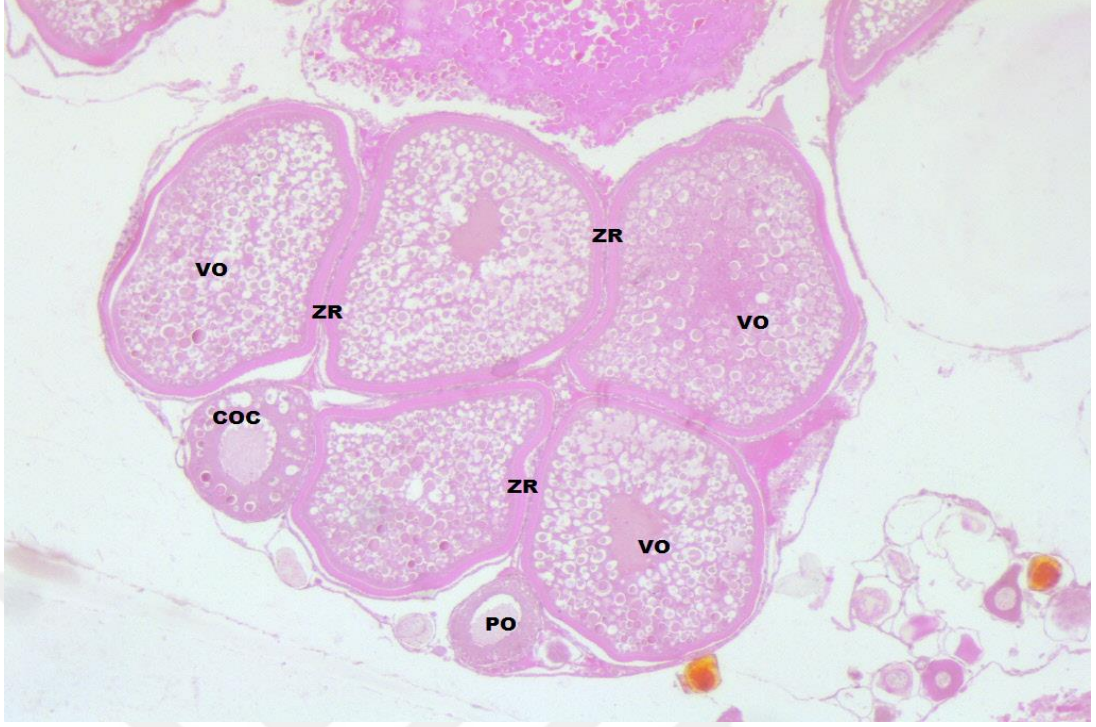
Şekil 4.16. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, bağ doku (BD), atretik oosit (AO), Hematoksilen&Eosin, X40



Şekil 4.17. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu; primer oosit (PO), bağ doku (BD), atretik oosit (AO), Kortikal alveoler oosit (COC), Zona radiata (ZR), Ooplazma (O), Hematoksilen&Eosin, X40



Şekil 4.18. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, zona radiata (ZR), Primer oosit (PO), Vitellojenik oosit (VO), bağ doku (BD), atretik oosit (AO), Hematoksilen&Eosin, X40



Şekil 4.19. 0,50 mM ENU ya iki saat maruz kalan Zebra balığı ovaryumu, Kortikal alveoler oosit (COC), Vitellojenik oosit (VO), Primer oosit (PO), zona radiata (ZR), Hematoksilen&Eosin, X40

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ENU maddesine maruz bırakılan zebra balığının ovaryum dokusu histolojik açıdan incelendi. Çalışmamızda kullandığımız mutajen, teratojen, kanserojen özelliği olan ENU'nun 0,25 mM ve 0,50 mM dozları belirlenerek deneyde kullanıldı. İki gruba 0,25 mM ENU uygulandı. Fakat bir grup bir saat 0,25 mM ENU'ya maruz kalırken bir grupta üç gün arayla birer saat 0,25 mM ENU'ya maruz bırakıldı. Sonuç olarak bir grup bir saat 0,25 mM, bir grup iki saat 0,25 mM'lik ENU'ya maruz kaldı. Bu işlem 0,50 mM ENU içinde aynı şekilde yapıldı. Beşinci gün sonunda disekte edilen balıklardan ovaryumlar alınarak histolojik açıdan incelendi. Bir saat ENU'ya maruz kalan 0,25 mM'lik zebra balığı ovaryumunda ooplazma ile zona radiata arasında açılmalar gözlemlendi. Primer oosit sayısında artışlar gözlemlendi. Doz oranı arttıkça deformasyona uğrayan oosit sayısında da artış gözlemlendi. Bir saatlik 0,50 mM'lik doz grubunda çekirdek büyümesi ve şekil bozukluğu gibi deformasyonlar gözlemlendi. Oosit sayısında artış gözlemlendi. İki saat ENU'ya maruz kalan zebra balıklarında ise 0,25 mM'lik doz grubunda şekil bozukluğu, zona radiatada kalınlaşmalar, primer oosit sayısında artış gözlemlendi. 0,50 mM'lik doz grubunda ise diğer gruplardan farklı olarak atretik oosit sayısında artış ve farklı evrelerdeki oositlerin atretik oosite dönüşmesi tespit edildi.

Goth'ın (1980) sıçan ovaryumu üzerine yaptığı bir araştırmada sıçan ovaryumu üzerinde (100 µg/l [¹⁴C] ENU) DNA replikasyonu aşamasında eşleşmelerde hatalar olduğu gözlemlenmiştir. Bu hataların ENU kaynaklı olduğu savunulmuştur. 100 µg/l [¹⁴C] ENU ile sıçan ovaryum dokusunda CHO hücrelerinde büyüme noktalarında mutajenik lezyon gözlemlenmiştir. Bu lezyonlar replikasyon yapan genomun bazı bölümlerinde de gözlemlenmiştir.

Bir saat ENU'ya maruz kalan 0.25 mM ve 0,50 mM ile iki saat ENU'ya maruz kalan 0,25 mM, 0.50 mM gruplarında oosit şeklinde bozulmalar gözlenmiştir.

Maekawa ve ark. (1987) 100 ppm ENU kullanarak sıçanda oluşan değişimleri tespit etmişlerdir. Maekawa ve arkadaşlarının çalışmasında ENU tümör oluşumunu desteklerken çalışmamızda ise ovaryum dokusunda histolojik deformasyonlara neden olmuştur. Sıçanlarda granüloza hücrelerinde bozulmalar olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması kapsamında ise ENU'ya maruz kalan zebra balıklarının 0,25 mM ile 0,50 mM'lik ovaryumlarında folikül epiteli ile zona radiata arasında açılmalar meydana geldiği görülmüştür. İncelemelerimiz sonucunda bir saatlik 0,50 mM ve iki saatlik 0,50 mM ENU ya maruz kalan zebra balığı ovaryumunda zona radiata kalınlaşması olduğu tespit edilmiştir..

Thaung ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada farede bulunan görme ile ilgili genleri belirlemeye hedeflemişlerdir. Farelere uyguladıkları ENU ile belirli lokulusları mutasyona uğratmıştır. Daha önce göz patofizyolojisinde olduğu tespit edilen genler ENU ile mutasyona uğradıkları gözlenmiştir. (Thaung ve ark., 2002)

Weber ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada 17a-etinilestradiol ve 4-nonilfenol maruz kalan zebra balığında gametogeneze etkisi incelenmiştir. Bu iki madde gametogenezi baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca folikül gelişiminin yavaşladığı ve folikül büyüklüğünde artış olduğu patolojik olarak incelenmiştir. ENU uygulanan zebra balıklarının histolojik olarak incelenmesi sonucunda oogeneze ket vurduğu görülmüştür. Ayrıca oosit gelişimini baskılayıp gelişen oositlerde ise deformasyona neden olduğu gözlenmiştir.

Draper ve arkadaşları (2004) da ENU'nun meydana getirdiği genetik mutasyonları zebra balığı ile yaptıkları deneyde ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında 1 mM ENU ile çeşitli yöntem uygulayarak; PCR, gen analizi, elektroforez ile DNA mutasyonları belirlemek için bu yöntemler kullanarak mutasyonları açıklanmıştır. (Draper, 2004). Bu genetik mutasyonlar sonucu DNA da hasarlar ortaya konulmuştur. Bizim çalışmamızda ise Draper'e göre az oranda ENU kullanmamıza rağmen histolojik

hasarlar gözlenmiştir. Kullandığımız dozların hepsinde bağ doku artışı ve atretik oosit sayısında artış olduğu belirlenmiştir.

Wang ve arkadaşlarının (2011) çalışmalarında zebra balığı ovaryumuna uyguladıkları $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ve $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ dozlarındaki nTiO_2 maddesinin etkileri incelenmiştir. İnceleme sonucunda $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ doz grubunda embriyo sayısında %25 azalma incelenmiştir. Histolojik açıdan zebra balığına uygulanan nTiO_2 'nin ovaryumda oosit üretimine etki ederek üremenin ve oosit sayısında azalmasına yol açtığı, embriyo sağkalımının azalmasına neden olduğu incelenmiştir. (Wang ve ark., 2011). nTiO_2 oosit sayısında azalmaya neden olurken aynı etki ENU ile yaptığımız çalışmamızda da incelenmiştir. ENU maddesi oogenez aşamasındaki gelişen oositlerin histolojik yapılarında bozulmaya neden olduğu incelenmiştir. ENU ve nTiO_2 düşük dozda dahi oosit gelişimini olumsuz etkiledikleri incelenmiştir.

Daouk ve arkadaşlarının (2011) yaptığı bir çalışmada poliklorlu bifenil uygulanan zebra balığı ovaryumunda atretik oositlerde artış olduğunu gözlenmiştir. ENU uygulanan zebra balıklarında uygulanan doz oranı arttıkça atretik folikül sayısında artış olduğu incelenmiştir. Poliklorlu bifenillerin olgunlaşan folikül sayısında azalma olurken ENU maddesi ise primer oosit sayısında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak mutajen, teratojen ve kanserojen özelliği olduğu bilinen ENU maddesinin düşük dozları bile oosit yapılarında olumsuz etkileri olduğunu farklı çalışmalarda desteklenmektedir. Çalışmamızda kullandığımız düşük dozların dahi zebra balığı ovaryum dokusunda farklı oosit yapılarında bozulmalara neden olduğu izlenmiştir. Bu etkiler sonucunda zebra balığı üreme fonksiyonlarının bozulacağı ve popülasyonun bundan etkileneceği düşünülmektedir. Kullandığımız dozlar ile bulduğumuz sonuçları destekleyen farklı çalışmalar olduğu görülmüştür. Oosit yapılarında gerçekleşen bozulmalar üremeyi etkileyecek niteliktedir. Kullandığımız ENU dozlarının, ENU ile yapılacak çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbulut, C., & Koç, N. D. 2000. Bisfenol A'nın Zebra Balıklarında (*Danio rerio*) Teratolojik Etkileri. Sakarya University Journal of Science, 17(1), 105-111.
- Anderson, E. 1968. Cortical alveoli formation and vitellogenesis during oocyte differentiation in the pipefish, *Syngnathus fuscus*, and the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Journal of Morphology, 125(1), 23-59.
- Aytekin, Y., Yön, N. D. K., Yüce, R., (2008). Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). Brazilian Archives of Biology and Technology, 51(3), 513-522
- Çakıcı, Ö. & Üçüncü, S. İ., 2007. Oocyte development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: *Cyprinidae*). EU Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, 24(1-2), 137-41.
- Çakıcı Ö. 2001. Zebra Balığı'nda (*Brachydanio Rerio*) Ovaryum Ve Yumurta Gelişiminin İncelenmesi Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
- Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., ... & Cousin, X. 2011. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. Aquatic toxicology, 105(3-4), 270-278.
- De Bruijn, E., Cuppen, E., & Feitsma, H. 2009. Highly efficient ENU mutagenesis in zebrafish. In Zebrafish (pp. 3-12). Humana Press.
- Din, 2002. Basisvalidierung genormter Verfahren zur wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung- Validierungsdokument (38415- T6), p. 27.
- Draper, B. W., McCallum, C. M., Stout, J. L., Slade, A. J., & Moens, C. B., 2004. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in Zebrafish. In Methods in Cell Biology (Vol. 77, pp. 91-112). Academic Press
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., Schmaehl, D., Afkham, J., Blum, G., Schneider, H. 1967. Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Zeitschrift für Krebsforschung, 69(2), 103-201.
- Dooley, K., & Zon, L. I. 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. Current opinion in genetics & development, 10(3), 252-256.
- Gürsoy, E., Koptagel, E.: "Embriyoloji Atlası" Esnaf Ofset Matbaacılık, Sivas, Türkiye (1997).

- Goth-Goldstein, R. 1980. Inability of Chinese hamster ovary cells to excise O⁶ alkylguanine. *Cancer Research*, 40(7), 2623-2626.
- Justice, M. J., Carpenter, D. A., Favor, J., Neuhauser-Klaus, A., De Angelis, M. H., Soewarto, D. & Weber, J. S., (2000). Effects of ENU dosage on Mouse strains. *Mammalian Genome*, 11(7), 484-488
- Kayhan, F. E. B., Kızılkaya, Ş. T., Duruel, H. E. E., & Kaymak, G. 2018. Fluoksetin-HCl'in (FLX) Zebra Balığı (*Danio rerio* Hamilton, 1822) Kalp Dokusu Üzerine Günlük Doza Bağlı Etkileri. *Türk Yaşam Bilimleri Dergisi*, 3(2), 272-276.
- Koç, N.D., Zebra balığının (*Branchydanio rerio*) primordiyal germ hücrelerinin göç sürecinde deltamethrin uygulamasının etkileri, Marmara Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2008.
- Knapik, E. W. 2000. ENU mutagenesis in zebrafish—from genes to complex diseases. *Mammalian genome*, 11(7), 511-519.
- Lambert, J. G. D. 1970. The ovary of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 107(1), 54-67.
- Lieschke, G.J. and Currie, P.D., “Animal models of human disease: Zebrafish swim into view”, *Nat. Rev. Genet.* 8(5): 353-67, 2007.
- Maekawa, A., Onodera, H., Tanigawa, H., Furuta, K., Kanno, J., Ogiu, T., & Hayashi, Y. 1987. Experimental induction of ovarian Sertoli cell tumors in rats by N-nitrosoureas. *Environmental Health Perspectives*, 73, 115-123
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P., & Woutersen, R. A. 2011. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic pathology*, 39(5), 759-775
- Mills, D., 1986, Akvaryum Bakımı. Çevirenler: Eşar Kütevin, Ziya Kütevin, 1994, İnkılap Kitapevi, İstanbul, 975-10-0641-4.
- Nagahama, Y., 1983. The Functional Morphology of Teleost Gonads. In: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randal and E. M. Donaldson (Eds). Vol. IXA, pp. 223-275. Academic Press. New York.
- 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
- Russell, W. L., Kelly, E. M., Hunsicker, P. R., Bangham, J. W., Maddux, S. C., & Phipps, E. L. 1979. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5818-5819.
- Sarras Jr, M. P., Leontovich, A. A., & Intine, R. V. 2015. Use of Zebrafish as a model to investigate the role of epigenetics in propagating the secondary complications observed in diabetes mellitus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 178, 3-7
- Santoriello, C., & Zon, L. I. (2012). Hooked! Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2337-2343.
- Selman, K., Wallace, R. A., Sarka, A., & Qi, X. 1993. Stages of oocyte development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Morphology*, 218(2), 203-224

- Smith, C., Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., (2007). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". Biological Reviews 83 (1) 13–34.
- Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., & Driever, W. 1994. Efficient recovery of ENU induced mutations from the Zebrafish germline. Genetics, 136(4), 1401-1420.
- Şişman, T., (2007). Poliklorlu Bifenil Bileşiklerinin *Danio rerio*'nun (Zebra Balığı) Gelişimi Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Şişman, T., & Geyikoğlu, F. 2010. PCB 126'ya Maruz Kalmış Zebra Balığı (*Danio rerio*) Larvalarındaki Sensorimotor Hasarlar. TÜBAV Bilim Dergisi, 3(1), 61-66.
- Timur, M., 2006. Balık Fizyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım No: 957.
- Thaung, C., West, K., Clark, B. J., McKie, L., Morgan, J. E., Arnold, K., ... & Jackson, I. J. (2002). Novel ENU-induced eye mutations in the mouse: models for human eye disease. Human molecular genetics, 11(7), 755-767.
- Van der Sar, A. M., Appelmelk, B. J., Vandenbroucke-Grauls, C. M., & Bitter, W. (2004). A star with stripes: zebrafish as an infection model. Trends in microbiology, 12(10), 451-457.
- Viana, I. K. S., Gonçalves, L. A., Ferreira, M. A. P., Mendes, Y. A., & Rocha, R. M. 2018. Oocyte growth, follicular complex formation and extracellular-matrix remodeling in ovarian maturation of the imperial Zebra pleco fish *Hypancistrus Zebra*. Scientific Reports, 8(1), 13760
- Wang, J., Zhu, X., Zhang, X., Zhao, Z., Liu, H., George, R., ... & Chen, Y. 2011. Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles. Chemosphere, 83(4), 461-467.
- Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. Aquaculture 34, 115– 145.
- Weber, L. P., Hill Jr, R. L., & Janz, D. M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. Aquatic toxicology, 63(4), 431-446.
- Wixon, J., 2000. Featured organism: *Danio rerio*, the Zebrafish. Yeast 17, 3: 225-231.
- Wylie C.C.: "The Biology of Primordial Germ Cells", Eur Urol, 23 (1993) 62-7..
- Yön, N. Aytekin, Y., & Yüce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). Brazilian Archives of Biology and Technology, 51(3), 513-522
- Zhang, B., Xuan, C., Ji, Y., Zhang, W., & Wang, D. 2015. Zebrafish xenotransplantation as a tool for in vivo cancer study. Familial Cancer, 14(3), 487-493.

ÖZGEÇMİŞ

Van'ın Erciş ilçesinde 1991 yılında doğdu. Yedi çocuklu bir ailenin beşinci çocuğudur. Liseyi Bursa'da tamamladıktan sonra Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümünde Yüksek lisans eğitime devan etmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.

