EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

SODYUM LAURYL SÜLFAT'IN *POECILIA RETICULATA*'NIN BAŞ BÖBREĞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

Tülin ÇETİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 11.09.2015

Bornova-İZMİR

2015

Tülin ÇETİN tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan **"Sodyum Lauryl Sülfat'ın *Poecilia Reticulata*'nın Baş böbreği Üzerine Etkilerinin Histolojik İncelenmesi"** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **11.09.2015** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:		**İmza**
Jüri Başkanı	**: .....**	**.....**
Raportör Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**
Üye	**: .....**	**.....**

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum "SODYUM LAURYL SÜLFAT'IN *POECILIA RETICULATA*'NIN BAŞ BÖBREĞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11/09/2015

Tülin ÇETİN

ÖZET

SODYUM LAURYL SÜLFAT'IN *POECILIA RETICULATA*'NIN BAŞ BÖBREĞİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

ÇETİN, Tülin

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ
Eylül 2015, 157 sayfa

Bu tez kaspamında sodyum lauryl sülfat'ın (SLS) model organizma olarak son yıllarda farklı alanlarda sıkça kullanılan *Poecilia reticulata*'nın baş böbreği üzerindeki toksik etkilerinin histolojik olarak ortaya konması amaçlanmıştır. Ergin örneklerin dört farklı subletal konsantrasyonda (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L) 96 saat süreyle suda çözünmüş SLS'ye maruz bırakıldığı bir deney gerçekleştirilmiştir. Kontrol ve deneme gruplarından alınarak histolojik yapıları tanımlanan baş böbreği örnekleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sunulan tezde özellikle endokrin işlevi ve histolojik yapısı esas alınarak *P. reticulata*'da baş böbreğinin konumu belirlenmiş; hematopoetik dokuda gerçekleşen süreçler de ortaya konmuştur. SLS konsantrasyon artışına paralel olarak glomerulus çapında ve Bowman alanında genişlemeye, tübül epitellerinde atrofi ve hipertrofiye, nukleus deformasyonlarına, vakuolleşmeye ve infiltrasyona neden olmaktadır. Bütün bu histopatolojik değişimler konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. SLS, hematopoetik dokuda ayrıca granülom oluşumlarına, hemoraji ve nekroza neden olmaktadır. Endokrin işlevi yanısıra çevresel stres biyoindikatörü olarak nitelendirilebilen interrenal ve kromaffin hücrelerde yapılan istatistiksel analizler konsantrasyona bağlı hipertrofiyi işaret etmektedir.

Bu araştırmanın, sürfaktanların teleostlarda farklı fizyolojik süreçler üzerindeki zararlı etkileri hakkında yeni bir bakış açısı getirmesi umulmaktadır.

Anahtar sözcükler: Sodyum Lauryl Sülfat, *Poecilia reticulata*, baş böbreği, ekotoksikoloji.

ABSTRACT

THE HİSTOPATOLOGİCAL EFECTS OF SODİUM LAURYL SULPHATE ON HEAD KİDNEY OF *POECILIA RETICULATA*

ÇETİN, Tülin

PhD in Biology
Supervisor: Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ
September 2015, 157 pages

In this thesis, it was aimed to determine the toxic effect of sublethal concentration of sodium lauryl sulphate (SLS) on head kidney of *Poecilia reticulate,* which is widely used in various researches as a model organism. An acute toxicity experiment was performed on adult specimens exposed to four concentrations (3 mg/L, 6 mg/L, 9 mg/L, 12 mg/L) of the water soluble of SLS for 96 hours. The head kidney of control and exposed fishes were dissected, investigated histologically and analyzed comparatively.

The localization of head kidney of *P. reticulata* was determined and this determination was based on especially its endocrin functions and histological structure. Cell lineages of haemopoietic tissue of the head kidney were also determined. SLS was given rise to expanding of the Bowman space and glomerular diameters; and the lesions were described in the tubular epithelium as atrophy and hypertrophy, nuclear deformations, vacuolizations and infiltrations. All of the histopathological changes were concentration dependent. SLS was also caused the formation of granulomas, hemorrhage and necrosis in haemopoietic tissue. Statistical analyses showed that, hypertropic interrenal and chromaffin cells could be used as bioindicators of environmental stress.

It is expected that these research would be provide new aspect hazardous effects of surfactants on different physiological processes on teleosts.

Keywords: Sodium lauryl sülfat (SLS), *Poecilia reticulata*, head kidney, ecotoxicology.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince beni destekleyen, bilimsel düşüncelerinin yanısıra yaşam ile ilgili deneyimlerini de benimle paylaşan ve yol gösteren danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Sema İŞİSAĞ ÜÇÜNCÜ'ye sonsuz teşekkürler.

Bu çalışmayı 2010-FEN-062 numaralı proje kapsamında destekleyen Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Fon Saymanlığına ve Bornova Belediyesi Mevlana Toplum ve Bilim Merkezinin kurulumunu destekleyerek benim gibi lisansüstü arkadaşlarıma çalışma imkânı sağlayan Bornova Belediyesine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

TEŞEKKÜR xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xvii

ÇİZELGELER DİZİNİ xxv

1. GİRİŞ 1

1.1 Deterjan Etkin Maddeleri Olarak Sürfaktanlar 3

1.1.1 Sürfaktanların sınıflandırılması ve genel özellikleri 4

1.1.2 Sodyum lauryl sülfat (SLS) 8

1.2 Deterjanlar, Sürfaktanlar ve Balıklar 10

1.3 Bir Model Organizma Örneği: *Poecilia Reticulata* 18

1.4 Teleostlarda Böbrek ve Baş Böbreği 21

1.4.1 Böbrek: genel bilgi 21

1.4.2 Baş böbreği 23

1.4.3 Baş böbreğinin işlevleri 24

1.5 Sunuş 35

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2. MATERYAL VE METOT 37

2.1 Materyal 37

2.1.1 Deney hayvanları 37

2.1.2 SLS 38

2.2 Metot 38

2.2.1 Ortam koşulları 38

2.2.2 Uygulama 40

2.2.3 Histolojik incelemeler 40

2.2.4 İstatistiksel değerlendirmeler 41

3. BULGULAR 43

3.1 Kontrol Grubunda Baş Böbreği: Genel Yapı 43

3.2 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Renal Elemanları 46

3.3 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Hematopoetik Elemanları 47

3.3.1 Eritrositlerin gelişimi 50

3.3.2 Granüllü lökositlerin gelişimi 51

3.3.3 Granülsüz lökositlerin gelişimi 53

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.3.4 Kontrol grubunda melanomakrofajların pigment içerikleri 55

3.4 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Endokrin Elemanları: İnterrenal ve Kromaffin Hücreler 56

3.5 SLS Uygulaması 58

3.5.1 Renal elemanlar üzerindeki etkiler 58

3.5.2 Hematopoetik elemanlar üzerindeki etkiler 75

3.5.3 Endokrin elemanlar üzerindeki etkiler 81

3.5.4 İstatistiksel değerlendirmeler 82

4. SONUÇ VE TARTIŞMA 95

4.1 Genel Değerlendirme 95

4.2 Kontrol Grubunda Histolojik Yapı 97

4.2.1 Baş böbreği-kaudal böbrek ayrımı, renal korpüskül ve tübüller 97

4.2.2 Hematopoetik doku ve işlevler 99

4.2.3 İmmün işlevler: lenfoid doku ve melanomakrofaj merkezleri 106

4.2.4 Endokrin işlevler: interrenal ve kromaffin hücreler 109

4.3 SLS Uygulaması ve Sonuçları 112

4.3.1 Renal korpüskül ve tübüller üzerindeki etkiler 112

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3.2 Hematopoetik dokulardaki etkiler 116

4.3.3 Lenfoid doku ve melanomakrofaj merkezlerindeki değişimler 119

4.3.4 İnterrenal ve kromaffin hücrelerdeki değişimler 120

4.4 Sonuç 124

KAYNAKLAR DİZİNİ 127

ÖZGEÇMİŞ 157

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil Sayfa

1.1 SLS'nin açık formülü 8

1.2 Bazı teleost türlerinde böbreğin ventraden görünümü. Baş böbreği (BB), Hava Kesesi (HK). *1. Oncorhynchus mykiss; 2. Cyprinus carpio; 3. Misgurnus anguillicaudatus; 4. Anguilla japonica; 5. Channa argus; 6. Plotosus anguillaris; 7. Niphon spinosus; 8. Prionurus microlepidotus; 9. Pterois lunulata; 10. Lepidotrigla microptera; 11. Hoplobrotula armata; 12. Paralichtys olivaceus; 13. Carassius auratus; 14. Parasilurus asotus; 15. Hexagrammos otakii* (Gallo and Civinini, 2003'den değiştirilerek) 22

1.3 Balıklarda farklı hematopoetik süreçlerdeki hücrelerin şematik gösterimi (Kondera, 2011'den değiştirilerek). 25

1.4 Üç farklı familya üyesini temsil eden türlerin böbreğinde interrenal doku ve kromaffin hücrelerin yerleşimi. Kromaffin hücreler büyük noktalarla, steroid salgılayan hücreler ise küçük noktalarla gösterilmiştir. P: Perciformes (*Dicentrarchus labrax*); C: Cyprinodontiformes (*Gambusia affinis*); ve S: Salmoniformes (*Oncorhynchus mykiss*). Akv, anterior kardinal vena; dC: Cuvier kanalı; kv: kaudal vena; b: böbrek; bb: baş böbreği; pkv: posterior kardinal vena; pk: posterior böbrek (Milano and Chimenti, 1999; Gallo and Civinini, 2003'den alınmıştır). 34

2.1 Erkek (A) ve dişi (B) *Poecilia reticulata* örnekleri. 37

2.2 Laboratuvarda kurulan düzenek. A. İlk örneklerin bulunduğu akvaryum. B. Düzeneğin bulunduğu ortam. C. Yavruluklar içindeki hamile dişiler. D. Yavruların bulunduğu akvaryum. E. Ticari olarak temin edilen 120 litrelik bitkili akvaryum. 40

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.1 *P. reticulata*'da böbrek (A) ve baş böbreği (B). 43

3.2 Erkek *P. reticulata* örneğinden hazırlanan total kesitte böbreğin diğer organlara göre konumu. PAS. 44

3.3 Baş böbreğinin genel histolojik yapısı. Renal korpüskül (RK), tübüller (RT) ve toplayıcı kanallarla sinüzoidleri (S) çevreleyen hematopoetik dokuda (HD) melanomakrofaj merkezleri (MM) ile posterior kardinal vena (PKV) çevresindeki interrenal (çember içerisinde) ve kromaffin hücreler (dikdörtgen içerisinde). H&E. 45

3.4 *P. reticulata*'da gövde böbreğinde daha sık izlenen renal korpüsküller (oklar). H&E. 45

3.5 Kontrol grubunda renal korpüskül. Bowman kapsülünün dıştan retiküler fibrillerle desteklenen (ok) pariyetal tabakası (P) altında Bowman alanı (yıldız); podositlerden (daire içerisinde) oluşan visseral tabakada mezangiyal hücreler (dikdörtgen içerisinde). PAS. 46

3.6 Baş böbreğinde genel yapı. Post kardinal vena (PKV) ve kollarını (♦) çevreleyen hematopoetik dokuda; S: sinüzoidler, E: eritrositler, GL: granüllü lökositler, M: monositler, L: limfosit, RH: retiküler hücreler, RF: retiküler fibriller, YH: yağ hücreleri, ayrıca interrenal (İ) ve kromaffin hücreler (K) ile renal tübüller (RT) PAS. 47

3.7 Kontrol grubunda eritrositler (E), lenfositler (L), granüllü lökositler (oklar) ve bir öncül hücre (daire içerisinde). PAS. 48

3.8 Kontrol grubu baş böbreği, hematopoetik dokudan yayma preparasyon. Blast hücreler (B) ile eritropoetik (E), granülopoetik (G), lenfopoetik (L) hücreler. Wright&Giemsa. 50

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.9 Kontrol grubunda eritropoesiz aşamaları. A: Proeritroblast, B: Bazofilik eritroblast, C: Polikromatik eritroblast, D: Ortokromatik eritroblast, E: Genç eritrosit, F: Eritrosit. Wright&Giemsa. 51

3.10 Kontrol grubunda nötropoezis aşamaları. A: Nötrofilik progranülosit, B: Nötrofilik metagranülosit, C: Band nötrofil, D: İki parçalı nötrofil. Wright&Giemsa. 52

3.11 Kontrol grubunda granülopoezis aşamaları. A: Eozinofilik progranülosit, B: Eozinofilik meta granülosit, C: Band eozinofil, D: Parçalı eozinofil. Wright&Giemsa. 53

3.12 Kontrol grubunda lenfopoezis aşamaları. A: Lenfoblast, B: Prolenfosit, C: Lenfosit, D: Proplazmosit, E ve F: Plazmosit. Wright&Giemsa. 54

3.13 Kontrol grubunda monosit gelişim aşamaları. A: monoblast, B: promonosit, C: monosit, D: Apoptotik bir eozinofili ve diğer kalıntıları sindiren makrofaj. Wright&Giemsa. 55

3.14 Kontrol grubu melanomakrofaj merkezlerinde farklı madde içerikleri. A: melanin (musikarmin); B: protein (PAF); C: glikojen (PAS); D: hemosiderin (Prussian blue). 56

3.15 Post kardinal vena (PKV) çevresinde poligonal interrenal (İ) ve açık renkli kromaffin hücreler (K). PAS. 57

3.16 Kan damarları (kd) çevresinde interrenal (İ) ve kromaffin hücreler (K). MT. 57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.17 3 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H); ayrıca vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon (içi boş ok). H&E. 58

3.18 3 mg/L SLS uygulama grubu. Stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübüllerde hipertrofi (çokgen içerisinde) ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); tübül lümeninde glikojen benzeri madde birikimi (ok başı) ile melanomakrofaj merkezleri (MM). PAS. 59

3.19 3 mg/L SLS uygulama grubu. Sağ üstte düzgün yapılı bir renal tübülün (dikdörtgen içerisinde) lümeninde glikojen birikimi; Bowman alanı (yıldızlar) ile glomerular kapilleri (elle çizilmiş) genişlemiş bir renal korpüskül; hematopoetik dokuda hemorajinin (H), stromadan ayrılmış (çift yönlü ok) ve epiteli atrofik (çokgen içerisinde) bir renal tübül içerisine ilerlemesi (ok); ayrıca iri bir granülom (G). H&E. 60

3.20 3 mg/L SLS uygulama grubu. Düzgün renal tübül epitelinin apikalinde (a), hafifçe bozulan tübülün lümeninde ağsı görünümde (b) ve yakınında melanomakrofaj merkezi (MM) izlenen bozulmuş renal tübül lümeninde kompakt haldeki (c) granüler yapılaşmalar. PAS. 61

3.21 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde) ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); hematopoetik dokuda hemoraji (H); ayrıca nekrotik bölgeler (N) ve infiltrasyon (içi boş ok) ile melanomakrofaj merkezi (MM). PAS. 62

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.22 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); hematopoetik dokuda nekrotik bölgeler (N) ile melanomakrofaj merkezi (MM). PAS..... 63

3.23 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde, vakuolizasyon (içi boş ok başı), infiltrasyon (içi boş ok) ve küçük bir granülom (G). H&E. 64

3.24 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde, ayrılmalar (mavi oklar) vakuolizasyon (içi boş ok başı), infiltrasyon (içi boş ok) ve tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı). H&E..... 65

3.25 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanı (yıldız) ve glomerular kapillerleri (elle çizilmiş); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), vakuolizasyon (içi boş ok başı), piknotik nukleus (daire içerisinde) ve infiltrasyon (içi boş ok); hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N). H&E. 66

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.26 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanı (yıldız) ve glomerular kapillerleri (elle çizilmiş); renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), piknotik nukleus (daire içerisinde) ve infiltrasyon (içi boş ok) ve hematopoetik dokuda melanomakrofaj merkezi (MM). PAS. 67

3.27 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). H&E. 68

3.28 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). H&E. 69

3.29 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); hematopoetik dokuda iki büyük granülom (G). PAS. 69

3.30 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda nekrotik bölgeler (N); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); infiltrasyon, hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). PAS. 70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.31 9 mg/L SLS uygulama grubu. Granülom içerisinde vakuoller (v), küçük nukleuslu hücreler arasında makrofaj benzeri hücreler (elips içerisinde). H&E. 71

3.32 9 mg/L SLS uygulama grubu. Hematopoetik doku genel görünümde melanomakrofaj merkezleri (MM). PAS. 72

3.33 12 mg/L SLS uygulama grubu. Genel görünümde renal tübüllerin arasında çok sık rastlanan granülomlar (elle çizilmiş). MT. 73

3.34 12 mg/L SLS uygulama grubu. Stromadan ayrılan (çift yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon; hematopoetik dokuda granülomlar (G). H&E. 73

3.35 12 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), piknotik nukleus (daire içerisinde), vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon; hematopoetik dokuda renal tübülün yapısını bozan granülomlar (G). H&E. 74

3.36 12 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde helozon benzeri granülom oluşumu (G), ayrıca hipertrofik hücreler. MT. 75

3.37 Uygulama gruplarında eritropoetik seri. 76

3.38 Uygulama gruplarında olgun eritrosit nukleuslarında şekil değişimleri. 77

3.39 Uygulama gruplarında eozinofil serisi. 78

3.40 Uygulama gruplarında izlenebilen nötrofil serisi 79

3.41 Uygulama gruplarında izlenebilen lenfosit serisi 80

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil Sayfa

3.42 Uygulama gruplarında monosit serisi..... 81

3.43 Uygulama gruplarında endokrin elemanlar. A. 3mg/L SLS uygulama grubu; B. 6 mg/L SLS uygulama grubu; C. 9 mg/L SLS uygulama grubu; D. 12 mg/L SLS uygulama grubu. K: Kromaffin hücreler, İ; İnterrenal hücreler..... 82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge Sayfa

1.1 Yaygın olarak kullanılan sürfaktanlar, kısaltmaları ve sınıfları, (*) ticari önemi büyük olanlar (Ying, 2006; Ivankovic and Hrenovic, 2010'dan, değiştirilerek alınmıştır). 4

1.2 SLS'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri 9

1.3 Anyonik (AS), Katyonik (CS) ve noniyonik (NS) sürfaktanların (ANS) farklı balık türlerinde belirlenen toksisite parametreleri EC50: Deney canlılarının %50'sini etkileyen konsantrasyon; IC_{50}: Büyüme veya aktivitenin %50 kısıtlandığı konsantrasyon; LC_{50}: Deney canlılarının %50'sini öldüren konsantrasyon, NOEC: Gözlenebilir etki oluşturmayan konsantrasyon (Ying, 2006 ve Ivankovic and Hrenovic, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır. Sürfaktanların açılımları için Çizelge 1.1'e bakınız). 10

1.4 Balıklarda SLS için belirlenen akut toksisite değerleri. 14

3.1 Kontrol grubunda izlenebilen hematopoetik serilerde farklı hücrelerin gelişim aşamaları. 49

3.2 Glomerulus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer. 83

3.3 Glomerulus çap verileri için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; <0,05 83

3.4 Glomerulus çap verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05 ... 84

3.5 Glomerulus çap verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05..... 84

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge Sayfa

3.6 Bowman boşluklarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer. 85

3.7 Bowman boşluğu verileri için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; <0,05 85

3.8 Bowman boşluğu verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05 ... 86

3.9 Bowman boşluğu verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05. 86

3.10 İnterrenal hücre çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer. 87

3.11 İnterrenal hücre çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05..... 87

3.12 İnterenal hücre çap verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. .. 88

3.13 İnterenal hücre çap verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05. 88

3.14 İnterrenal hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer. 89

3.15 İnterrenal hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. 89

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge Sayfa

3.16 İnterrenal hücrelerde nukleus çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. 89

3.17 İnterrenal hücrelerde nukleus çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05. 90

3.18 Kromaffin hücre çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer..... 91

3.19 Kromaffin hücre çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. 91

3.20 Kromaffin hücre çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. 92

3.21 Kromaffin hücre çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05..... 92

3.22 Kromaffin hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer..... 93

3.23 Kromaffin hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05..... 93

3.24 Kromaffin hücrelerde nukleus çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05. 93

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Çizelge Sayfa

3.25 Kromaffin hücrelerde nukleus çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05. 94

1. GİRİŞ

Bilindiği üzere çevre kirliliğinde Sanayi Devrimiyle birlikte yükselmeye başlayan ivme sürekli artmış; özellikle kimyasal kirliliğinin insanlara ve doğaya verdiği zararlar günümüzde çok ciddi boyutlara ulaşmıştır. Çevreyi kirleten çok farklı kimyasal maddeler, bunların etkileri ve bu etkilerin olabildiğince engellenmesi için alınan önlemler hem kamuoyunda, hem de farklı bilimsel platformlarda geniş ölçüde araştırılarak tartışılmaktadır. Çevre ve zehir bilimlerinin ara kesitini oluşturan ekotoksikoloji bilim dalı ve özellikle sucul ekotoksikoloji bu doğrultuda büyük önem taşır. Çünkü standart düzeyde konfor sağlayan bir yaşam biçiminin sürekliliğini sağlayan tarım ile enerji başta olmak kaydıyla sanayi sektörleri; tüm üretim-pazarlama-satış-kullanım ve bertaraf süreçlerinde ekosistemleri tehdit eder. Sürekli kullanılan çeşitli kimyasallar canlı doku, organ ve sistemlerinde oluşturdukları olumsuz etkilerle, doğal çevrede bazen geri dönüşü mümkün olmayan hasarlara yol açabilirler.

Günlük yaşamda çevresel etkilerini neredeyse hiç akla getirmeden, çok sık kullandığımız maddeler arasında sentetik deterjanlar büyük yer tutar. Bu kimyasallar birçok temizleme malzemesinin esasını oluştururlar, kişisel bakım ürünlerinde, tekstil ve boya sanayinde, çeşitli polimerlerin, pestisitlerin formülasyonunda, farmasötiklerde, madencilikte, yağların geri dönüşümünde ve kâğıt endüstrisinde… çok geniş biçimde kullanılırlar. Ekonomik önemleri de o ölçüde büyüktür, öyle ki, 2006 yılındaki toplam üretimleri 12,5 milyon tonun üzerindeydi (Ivankovic and Hrenovic, 2010). Temelde anyonik, noniyonik ve katyonik olarak üç gruba ayrılan deterjanlar (Sigoillot and Nguyen, 1992); tüm üretim ve tüketim süreçlerinde kanalizasyonlar ve diğer yollarla çevre fazlarına sürekli karışmakta, dağılmakta, parçalanmakta ve farklı kimyasallarla etkileşime girmekte; böylece bakterilerden memelilere kadar çok geniş bir yelpazede etkili olabilmektedir (Könnecker et al. 2011). Sadece Akdeniz'e her yıl 60.000 ton civarında deterjan boşaltıldığı düşünüldüğünde (Brunelli et al. 2008), bu kimyasalların insan ve çevre sağlığı üzerindeki etkilerinin gözardı edilemeyecek boyutlarda olduğu açıktır.

Genel toksikoloji ve modelleme çalışmalarında en çok tercih edilen omurgalılar bilindiği gibi kemirgenlerdir. Tehdit altındaki sucul ekosistemlerle ilgili araştırmalarda ise besin zincirindeki yerleri ve ekonomik önemleriyle balıklar ön plana çıkar (Law, 2003; Ankley and Villeneuve, 2006; Dahm and Geisler, 2006; Kent et al., 2009; Costa et al., 2011; Agamy, 2012). Laboratuvar ortamına kolayca uyum sağlayan, deyim yerindeyse zahmetsiz materyaller olarak küçük tatlı su balıkları, son dönemlerde ekotoksikolojik araştırmaların temel materyalleri olmanın ötesine geçerek farklı açılımlar için önemli alternatifler haline gelmişlerdir. Bu canlılar kısa yaşam döngüleri, bakımlarının kolay ve ekonomik olması, kısa sürede çok sayıda yavru vermeleri gibi nitelikleriyle modelleme çalışmaları için gerçekten çok uygun materyallerdir (Toussaint et al., 2001; Hawkins et al., 2003; Law, 2003; Wang, et al., 2008). En bilinen örnek olarak *Danio rerio* gelişim biyolojisi ve genetik başta olmak üzere pek çok alanda uzun yıllardan beri kullanılır, ayrıca insan sağlığına yönelik çalışmalarda da çok sık tercih edilir. *Oryzias latipes*, *Pimephales promelas*, *Gasterosteus aculeatus* ve *Poecilia reticulata* türleri de farklı alanlarda model organizma olarak kullanılan tatlı su balıkları arasındadır (Law, 2003; Ankley and Villeneuve, 2006; Dahm and Geisler, 2006). Bunlardan *P. reticulata* sadece davranışla ilgili çalışmalar için değil; moleküler evrim, gelişim biyolojisi, populasyon genetiği, kanser ve ekotoksikoloji alanlarındaki araştırmalarda da kullanılan bir türdür (Khoo et al., 1999; Nakajima and Taniguchi, 2001; Reznick et al., 2001; Dahm and Geisler, 2006; Gerhard, 2007).

Çeşitli kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde, arazi çalışmalarının yanında subletal konsantrasyon deneyleri yapılarak histolojik parametrelerin değerlendirilmesi çok yaygın uygulamalardır (Wester et al., 2002; Van Der Ven et al., 2003; Troncoso et al., 2012). Histopatolojik incelemeler farklı kimyasallara öncelikle maruz kalan deri ve solungaçların yanısıra karaciğer ve böbrek gibi birincil hedef organlardaki değişimlerin de belirlenmesini hedefler, böylece toksik maddelerin etki mekanizmalarının ortaya konmasında altın anahtarlar olarak değerlendirilirler (Agamy, 2012; Hued et al. 2012).

Deterjanların farklı hedef doku ve organlardaki etkileriyle ilgili çalışmalar arasında, balıklardaki yapısı ve üstlendiği karmaşık görevlerle çok ilginç bir

yapılaşma olan baş böbreğine dair raporlar sınırlı sayıdadır. Sunulan tezde bir anyonik deterjan olan sodyum laurly sülfat'ın, model organizma olarak alınan *P. reticulata*'da baş böbreği üzerine etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1 Deterjan Etkin Maddeleri Olarak Sürfaktanlar

Sentetik deterjanlar petrol türevlerinden elde edilerek temizleme işlemlerinde kullanılan toz, granül, tablet, sıvı ya da jel formlarında kimyasal maddelerdir. Günlük yaşamda kullandığımız "deterjan" sözcüğü; kimyasal anlamda bu maddelerin %10-%30'unu oluşturan yüzey aktif maddeleri de kapsar (UNEP/WHO, 1996). Herhangi bir deterjanda etkin maddeden başka yoğunlaştırıcılar, dolgu maddeleri, oksitleyiciler, koku vericiler, yumuşatıcılar… bulunabilir.

Yüzey aktif maddeler bir sıvıda çözündükleri zaman yüzey gerilimini değiştiren, genellikle azaltan kimyasal bileşiklerdir ve İngilizce *"surface-active-agent"* sözcüklerinin kısaltmasından oluşan *"sürfaktan"* sözcüğü ile tanımlanırlar. Fransızca, Almanca, İspanyolca gibi diğer batı dillerinde bu sözcüğün tam karşılığı yoktur ve yerine genelde *"gerilim etkileyici"* anlamında sözcükler kullanılır.

Katı veya sulu çözeltiler (su içinde %30-95 aktif madde) şeklinde üretilen sürfaktanlar başta tüm deterjanlar ile sabunlar olmak üzere temizleyicilerin; şampuanlar, saç kremleri, diş macunları, ıslak mendiller gibi kişisel bakım ürünlerinin; çeşitli çözücüler, bakterisitler, antistatik kimyasallar, korozyon engelleyiciler gibi pek çok endüstriyel ürünün etkin maddeleridir. Deterjanların temel işleme mekanizması, polar-hidrofilik baş kısımları suyla etkileşirken nonpolar-hidrofobik kuyruk kısımları kir-yağ moleküllerini sarıp suyla birlikte uzaklaştırılmasını sağlayan sürfaktan molekülleri üzerinden çalışır.

Günlük yaşamda ve endüstriyel süreçlerde gerçekten çok yüksek miktarlarda sürfaktan kullanılır. Bu maddelerin dünyadaki toplam üretimi 2000'li yılların başında 7,2 milyon tondu; bu dönemde Batı Avrupa'da yıllık 4,2 milyon ton deterjan ve 1,2 milyon ton yumuşatıcı kullanılmaktaydı. 2006 yılında toplam

üretim 12,5 milyon tonu aştı, 2007'de ise sadece Batı Avrupa'da 3 milyon tonun üzerindeydi (Ivankovic and Hrenovic, 2010). Bu rakamlar sürfaktanların çevre üzerindeki etkilerinin önemle değerlendirilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

1.1.1 Sürfaktanların sınıflandırılması ve genel özellikleri

Genellikle baş gruplarının yüküne göre anyonik, katyonik, amfoterik ve noniyonik olarak sınıflandırılan sürfaktanlardan günümüzde en çok kullanılanlar kısaltılmış isimleri ve sınıflarıyla Çizelge 1.1'de izlenmektedir.

Çizelge 1.1 Yaygın olarak kullanılan sürfaktanlar, kısaltmaları ve sınıfları, (*) ticari önemi büyük olanlar (Ying, 2006; Ivankovic and Hrenovic, 2010'dan, değiştirilerek alınmıştır).

YAYGIN ADI	KISALTMASI	SINIFI
Linear alkilbenzen sülfonik asid	LAS(*)	**ANYONİK (ANS)**
Sekonder alken sülfonatlar	SAS	
Alkol eter sülfatlar	AES(*)	
Alkil sülfat	AS(*)	
Sodyum lauryl sülfat	SLS	
Alkil etoksisülfat	AES	
Kuarteriyel amonyum bileşiği	QAC(*)	**KATYONİK (CS)**
Benzalkonyum klorid	BAC	
Setilpridinyum bromid	CPB	
Setilpridinyum klorid	CPC	
Hekzadesiltrimetilamonyum bromid	HDTMA	
Alkil dimetil amonyum halojenürler	DMAC	
Dietil ester dimetil amonyum klorid	DEEDMAC	
Amine oxide	AO	**AMFOTERİK (ZS)**
Alkilfenol		
Alkilfenol etoksilat	APE(*)	**NONİYONİK (NS)**
Alkol etoksilat	AE(*)	
Fatty asid etoksilat	FAE	
Nonil fenol etoksilatlar	NPE	
Oktil fenol etosilatlar	OPE	

Çizelgede gösterilen anyonik sürfaktanlardan LAS, katyonik sürfaktanlardan kuarteriyel amonyum bileşiği (QAC), noniyonik sürfaktanlardan da alkil fenol etoksilat (APE)'nin çevresel etkileri üzerinde detaylı çalışmalar bulunmaktadır (Ying, 2006). Örneğin linear alkil benzen sülfonik asit (LAS); yer üstü sularında 0,4 mg/L; kanalizasyon sularında 1,1 mg/L konsantrasyonlarda, atık su arıtımında açığa çıkan çamurda ise 30,2 g/kg (kuru kütle) miktarında bulunabilir (Ivankovic and Hrenovic, 2010).

Çizelgede ilk sırada yer alan anyonik sürfaktanlar (ANS) grubu özellikle evlerde toz, granül, macun ve sulu çözeltiler gibi farklı formlarda kullanılan deterjan ve sabunların ana maddelerini kapsar; ayrıca bazı farmasötik formülasyonlarda ve kirlenmiş topraktan petrokimya ürünlerini uzaklaştırmak amacıyla kullanılan maddeleri de içerir. ANS grubu kimyasalların genel kullanım oranı tüm sürfaktanların %3-%5'ini oluşturur, sadece ev temizliği ve kişisel bakım ürünleri dikkate alındığında ise %20'ye kadar yükselir.

Ticari önemi büyük olan bu grup; OECD tarafından fizyokimyasal özellikleri, çevresel dağılımları ve ekotoksisite değerlerine göre yapılan sınıflandırmada alkil sülfatlar (AS), primer alken sülfonatlar (PAS) ve alfo-olefin sülfonatlar (AOS) olmak üzere üç alt kategoride toplanan 61 molekülden oluşmakta; bunlardan 21 tanesi yüksek miktarlarda tüketilmektedir (OECD, 2007). Könnecker et al. (2011) tarafından verilen rakamlara göre 2003 yılında ABD ve Kanada'da 118.000 ton; Batı Avrupa'da 105.000 ton ve Japonya'da 11.500 ton AS tüketilmiştir. AOS alt kategorisine giren kimyasalların aynı yıla ait tüketimleri ise Batı Avrupa'da 6000 ton, Japonya'da 3000 ton olarak gerçekleşmiş olup ABD ve Kanada verileri kaydedilmemiştir. Dolayısıyla ANS grubunda en çok tüketilen kimyasallar AS kategorisinde yer alanlardır.

Çevredeki AS konsantrasyonlarının atık sularda, yüzey sularında ve sedimentte düşük olduğuna dair raporlar varsa da (Könnecker et al., 2011); AS ve AOS alt kategorileri için deneysel verilere göre hesaplanabilen sediment-su bölünme katsayısı (K_{OC}) PAS kategorisi için hesaplanamamaktadır (Könnecker et al., 2011).Bu nedenle sürfaktanların genel anlamda akıbetlerine dair tahminlerin, çevredeki gerçek durumu tam olarak yansıtmayabilecekleri öne sürülmektedir.

Bu maddelerin çevrede oluşturabilecekleri zararlara dair kuşkular, dikkate alınmayan bazı özellikleri nedeniyle de artar. Sürfaktan molekülleri suda düşük miktarlarda çözündüklerinde monomer yapıdayken, konsantrasyon arttıkça sistemin serbest enerjisini azaltmak için kümeleşerek miseller oluşturur. Bu olayın gerçekleştiği eşik konsantrasyon kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır (Mukerjee and Yang, 1976) ve yüzey aktif maddelerin temizleme güçleriyle antibakteriyel niteliklerini de belirler: ANS ve CS grubunda CMC değeri NS grubuna göre daha yüksektir. LAS alt kategorisinde molekülün zincir uzunluğu arttıkça bu değer de artar. Çevrede herhangi bir zamanda ölçülen sürfaktan konsantrasyonları genelde düşük olduğundan CMC değeri toksisite belirlemeleri için dikkate alınmaz. Ancak çevrede CMC değerinin üzerindeki konsantrasyonlara ulaşan sürfaktanların sadece suda değil hidrofobik organik bileşiklerde de çözünmesiyle farklı kimyasal bileşikler oluşabileceği unutulmamalıdır. Çok yüksek kullanım miktarları ve en çok da kanalizasyonlar aracılığı ile çevreye yayıldıkları gerçeği eklendiğinde, sürfaktanların çevredeki davranışları biraz daha belirsizleşmektedir.

Fizikokimyasal nitelikleri sürekli değişen çevrede, bütün kimyasallar gibi sürfaktanlar da kendilerine özgü yapılarına bağlı olarak biyolojik dönüşüm süreçlerine girerler ve birçok mikroorganizma tarafından bozunabilirler. Biyobozunma süreçleri aerobik ve anaerobik ortamlarda gerçekleşebilir, örneğin AS grubu sürfaktanlardan LAS, nehir sularında, yani aerobik koşullardaki doğal mikrobiyal flora tarafından 7^{o}C sıcaklıkta bile %99 oranında biyobozunuma uğrayabilir, mikrobiyal etkinliğin düşük olduğu deniz suyunda ise biyobozunum süresi uzamaktadır. Topraktaki yarılanma ömrü 7-33 gün arasında olan bu kimyasalın anaerobik ortamda bozunduğuna dair veri yoktur. ANS grubunda AES ve AS'lerin biyobozunumu LAS'ye göre çok daha hızlıdır (Ying, 2006).

Sunulan tezde materyal olarak kullanılan sodyum lauryl sülfat ANS grubunda, AS alt kategorisinde yer almaktadır. Bu alt kategoriye giren moleküllerin hidrofobik kısmı genellikle farklı uzunluklarda alkil zincirinden, alkilfenil eter ya da alkibenzenden oluşur. Hidrofilik kısım ise karboksil, sülfat, sülfonat ya da fosfattan ibarettir. Bilindiği gibi herhangi bir organik kimyasalın lipofilite özelliği zincir uzunluğunun bir fonksiyonudur ve bu kimyasal için

toprağın tahmini absorbsiyon katsayısı da zincirdeki karbon halkası sayısına göre yükselir. Buna göre sodyum tuzları ve alkil sülfatların C_8-C_{14} arasında değişen karbon halkası sayıları 75-1600 L/kg arasında değişen absorbsiyon değerlerini belirler. Bu durumda zincir uzunluğu arttıkça çevre fazlarındaki absorbsiyon ve olası toksik etkiler artar.

Farklı karbon sayısına sahip AS zincirleriyle yapılan çalışmalara göre, balıklarda C_{12}-C_{16} için biyokonsantrasyon faktörü (BCF) 1,5–3 arasındadır, C_{18} için deneysel bir veri yoktur (Könnecker et al., 2011).

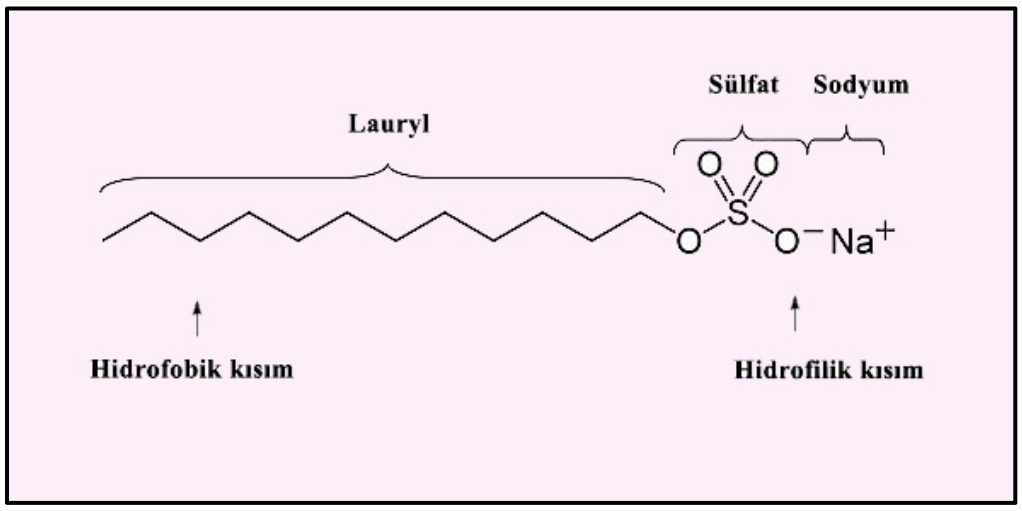
Çevredeki AS konsantrasyonları atık sularda, yüzey sularında ve sedimentlerde ölçülmüştür (Könnecker et al., 2011). Buna göre belli ölçüde arıtılmış atık sulardaki konsantrasyon 10 µg/L değerinin altındadır; sürekli artan kullanıma rağmen, arıtım amacıyla kullanılan bitkilerdeki birikimin sabit kaldığı da rapor edilmiştir; yerüstü sularındaki konsantrasyon 5-10,2 µ/L, sediment konsantrasyonları ise 0,0035-0,021 mg/kg arasındadır.

Procter ve Gamble firması tarafından bildirildiğine göre iki balık (*Pimephales promelas* ve *Ictalurus punctatus*) ve bir omurgasız (*Corbicula fluminea*) türünde 11-35 gün süreyle C_{14}-$_{15}$ AS uygulaması sonucunda BCF değerleri balıklar ve omurgasızlar için sırasıyla 180-422, 402-972 ve 81-400 L/kg olarak belirlenmiştir. Ayrı bir çalışmada (Könnecker et al., 2011) *P. promelas* için akut (4 gün) ve kronik (33 gün) C_{12} AS maruziyeti sonucunda kaydedilen BCF değeri 1-4 L/kg'dır. Görüldüğü üzere alkil sülfatların biyobirikimi sadece zincir uzunluklarına ve zincirdeki karbon atomu sayısına göre değil, araştırmada kullanılan türe göre de değişim göstermektedir.

Bu noktaya dek kaydedilen raporlar çerçevesinde AS grubu sürfaktanların çevresel etkileri hakkında bazı belirsizlikler bulunduğu; bu gruba giren ve sunulan tezin materyalini oluşturan sodyum lauryl sülfat hakkında daha detaylı bilgilere gereksinim olduğu ortadadır.

1.1.2 Sodyum Lauryl Sülfat (SLS)

AS grubu bir sürfaktan olan SLS; sodyum dodesil sülfat, sülfürik asit monododesil ester sodyum tuzu, lauryl sodyum sülfat, sodyum N-dodesil sülfat ve lauryl sülfat sodyum tuzu gibi farklı ticari isimlerle pazarlanmaktadır (Tupker et al., 1997; Joshi et al., 2007; Chaturvedi and Kumar, 2010; Könnecker et al., 2011). Molekül ağırlığı 288,38 g/mol olan SLS 12 karbon zincirinden oluşur (Şekil 1.1, Çizelge 1.2) ve kapalı formülü $CH_3(CH_2)_{11}OSO3Na$ olarak ifade edilir. Saf haldeyken suda çözünebilen beyaz, kristal, pul veya toz formundadır, kısmen alkolde de çözünebilir. Sulu çözeltilerdeki CMC değeri 25ºC sıcaklıkta 8,2 x 10^{-3} mol/L olarak verilir (Tupker et al., 1997; Könnecker et al., 2011). K_{oc} ve BCF değerleri alkil sülfatların 12 karbonlu üyelerine çok yakındır. 24 saat içinde %45-%95 olarak yüksek bir biyobozunum oranı gösterir (Brunelli et al., 2008; Könnecker et al., 2011).



Şekil 1.1 SLS'nin açık formülü (http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/SODIUM%20LAURETH%20SULFATE.htm-2015)

Çizelge 1.2 SLS'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri

(http://chemicalland21.com/specialtychem/perchem/SODIUM%20LAURETH%20SULFATE.htm -2015)

Kimyasal adı	Sodyum Lauryl Sülfat
Ticari isimleri	Sodyum dodesil sülfat, sülfürik asit monododesil ester sodyum tuzu, lauryl sodyum sülfat, sodyum N-dodesil sülfat ve lauryl sülfat sodyum tuzu
Kimyasal formülü	$CH_3(CH_2)_{11}OSO3Na$
CAS numarası	151-21-3
Fiziksel formu	Beyaz toz
Molekül kütlesi	288,38 g/mol
Erime ve donma noktası	206 ^oC
Yoğunluk	1.03 g/mL (20 ^oC)
Sudaki çözünürlük	150 g/l (20 ^oC)
Tutuşma sınırı	>100 ^oC

Anyonik sürfaktanlar arasında önemli miktarlarda üretildiği kaydedilen SLS, yüksek çözünürlük niteliği ile özellikle evsel ortamlarda temizleyicilerin ve diş macunu, şampuanlar gibi bazı kişisel bakım ve kozmetik ürünlerinin temel maddesidir (Könnecker et al., 2011). Ayrıca çözünmeyen aspirin formülasyonlarında yer aldığı ilaç sanayiinden elektroforez işlemlerine kadar çok geniş bir alandaki endüstriyel süreçlerde seyreltici veya yumuşatıcı olarak kullanılır (Rosety et al., 2001; Ribelles et al., 1995b; Kowalska et al., 2004; Chaturvedi and Kumar, 2010; Joshi and Sawant, 2006). Hem kullanım alanının genişliği, hem de sürekli üretilip deşarj edildiği düşünüldüğünde yüksek çözünürlük fazla anlam ifade etmez (Brunelli et al. 2008) ve sucul canlıların bu kimyasala sürekli maruz kalma olasılığı artar. Bir diğer deyişle, diğer AS grubu sürfaktanlar gibi SLS de özellikle sucul ortamlarda tehdit oluşturmaktadır, dolayısıyla bu maddelerin canlılar üzerindeki etkileri ayrıca değerlendirilmelidir.

1.2 Deterjanlar, Sürfaktanlar ve Balıklar

Günlük hayattaki muazzam tüketimleri sürfaktanların çevresel etkilerine gösterilen ilgiyi hep yüksek tutmakta; anyonik, katyonik ve noniyonik sürfaktanlara ilişkin sucul toksisite verileri literatürde geniş olarak yer almaktadır (Ying, 2006; Ivankovic and Hrenovic, 2010).

ANS, CS ve NS sürfaktanların değişik balık türlerinde uygulanmalarıyla sağlanan farklı parametrelerdeki toksisite değerleri Çizelge 1.3'de özetlenmiştir (Ying, 2006; Ivankovic and Hrenovic, 2010). Taboların alındığı kaynaklarda bakteriler, algler, yumuşakçalar gibi canlılara ilişkin değerlere ulaşılabilir.

Çizelge 1.3 Anyonik (AS), Katyonik (CS) ve noniyonik (NS) sürfaktanların (ANS) farklı balık türlerinde belirlenen toksisite parametreleri EC50: Deney canlılarının %50'sini etkileyen konsantrasyon; IC_{50}: Büyüme veya aktivitenin %50 kısıtlandığı konsantrasyon; LC_{50}: Deney canlılarının %50'sini öldüren konsantrasyon, NOEC: Gözlenebilir etki oluşturmayan konsantrasyon (Ying, 2006 ve Ivankovic and Hrenovic, 2010'dan değiştirilerek alınmıştır. Sürfaktanların açılımları için Çizelge 1.1'e bakınız).

SÜRFAKTAN GRUPLARI ANYONİK (ANS)	TÜRLER	TOKSİSİTE PARAMETRESİ VE DEĞERLER (mg/L)
C_{11}-C_{12} LAS	*Oncorhynchus mykiss*	NOEC-54 gün, 0,20
C_{12} LAS (SDBS)	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 3,63
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 8,81
	Carassius auratus	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 5,10
C_{12} AS (SDS)	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 33,61
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 40,15
	Carassius auratus	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 38,04
SDES	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 10,84
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 13,64
	Carassius auratus	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 12,35
KATYONİK (CS)		
C_{16} TMAC	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 1,21
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 8,24
	Carassius auratus	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 3,58
DTDMAC	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 0,74
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 7,91
	Carassius auratus	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 2,37
		Immobilizasyon, LC_{50}-24 saat 14,8
DEEDMAC	*Pimphales promelas*	Gelişim, NOEC-35 gün 0,68
QAC	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon, EC_{50}-48 saat 1,21
NONİYONİK (NIS)		
C_{12} EO 6	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 22.38
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 29,26
	Carassius auratus	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 28,02
C_{9}-$_{11}$ EO 6	*Pimphales promelas*	Ölüm LC_{50}-10 gün 2,70
OPE O6	*Salmo gairdneri*	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 6,44
	Gammbusia affinis	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 9,65
	Carassius auratus	Immobilizasyon EC_{50}-48 saat 9,24
NPEO 9	*Pimephales promelas*	Ölüm LC_{50}-96 saat 4,60
NP	*Pimephales promelas*	Ölüm LC_{50}-96 saat 0,30
AE	*Pimephales promelas*	Hayatta kalma, NOEC 4,35

Çizelgedeki verilere göre ANS grubunda EC_{50} değerleri genelde diğer iki gruba göre daha yüksektir, yani kullanılan türler ve hareketsiz kalma parametresi bağlamında ANS'lerin genelde diğer gruplara göre daha az toksik oldukları söylenebilir. Bu grupta 48 saatlik uygulamada en yüksek EC_{50} değerleri C_{12} AS

(SDS) için *Gambusia affinis, Carassius auratus* ve *Salmo gairdneri* için, sırasıyla 40,15 - 38,04 - 33,61 mg/L olarak verilmiştir. Aynı sürede, yine 12 karbon halkası içeren C_{12} LAS (SDBS) maruziyeti için aynı türlerde verilen EC_{50} değerleri ise yine sırasıyla 3,63 - 5,1 - 8,81 mg/L olarak, SDS değerlerinden çok düşüktür. Bir diğer deyişle 48 saatlik uygulamada hareketsiz kalma parametresi dikkate alındığında her üç tür de SDS'ye karşı daha yüksek tolerans gösterirler.

Bir diğer önemli parametre de türe göre değişimdir, örneğin SDBS verilerinde *S. gairdnerii* için 3,63 olan EC_{50} değerinin *G. affinis'*de 8,81 olarak adeta katlandığı izlenmektedir. Yani kullanılan parametreler dahilinde bu sürfaktan *S. gairdnerii'*de *G. affinis'*e oranla daha toksiktir.

Daha da çarpıcı olarak, aynı gruba giren sürfaktanlar için aynı türün tepkisinde de değişim görülebilir. ANS grubuna giren C_{12}LAS için *S. gairdnerii'*de 48 saatlik uygulama sonrasında, hareketsiz kalma parametresiyle ölçülen LC_{50} değeri 3,63 mg/L'dir. Yine ANS grubuna giren C_{12} AS için bu değer 33,61 mg/L olarak, yaklaşık 9 kat daha yüksektir. Bu iki sürfaktan için *G. affinis* ve *C. auratus*'da da benzer durum geçerlidir. Bu konuda bir diğer örnek de; *Pimephales promenas'*da 96 saatlik uygulamada LC_{50} değerlerinin, ikisi de NS grubuna giren ve nonilfenol yapısında olan sürfaktanlardan NP için 0,3 mg/L olarak çok düşükken, NPEO 9 için yaklaşık 15 kat daha yüksek, 4,6 mg/L olarak verilmesidir. Bir diğer deyişle, uygulanan örneklerin yarısını öldürecek olan NPEO 9 konsantrasyonu, aynı sonuca yol açacak NP konsantrasyonundan yaklaşık 15 kat daha yüksektir.

Görüldüğü üzere temel ekotoksikolojik parametrelere göre yapılan değerlendirmeler kullanılan sürfaktana, türe ve hatta aynı tür için benzer sürfaktanlara göre çok farklı sonuçlar verebilmektedir. Dolayısıyla her sürfaktan için değişik türlerde denemeler yapılarak veri birikiminin genişletilmesi gerekmektedir. Üstelik sadece temel ekotoksikolojik parametrelerden yola çıkarak olası çevresel hasar üzerinde konuşulamaz, çünkü NOEC, EC ve LC değerleri sadece sınırlı bilgi verir. Örneğin *Oncorhynchus mykiss* türünde 54 günlük LAS uygulaması sonunda 0,2 mg/L olarak kaydedilen NOEC değeri, larvaların solungaç epitelinde hipertrofiye neden olarak yüzme kapasitesini düşürmek için

yeterlidir (Ying, 2006). Benzer durum diğer gruplara giren sürfaktanlarda da izlenmektedir. Örneğin *Pimephales promelas*'da NS grubu sürfaktan olan AE uygulamasıyla belirlenen 0,73 mg/L olarak belirlenen NOEC değeri, yumurta üretimi ve larvaların hayatta kalma oranlarını ciddi ölçüde olumsuz etkilemektedir. Bu örneklerden de görüldüğü üzere, NOEC, EC ve LC değerlerinin altındaki konsantrasyonlarla çalışıldığında belirlenebilecek histopatolojik hasarlar bireyler ve populasyonların geleceğine ilişkin doğru tahminler için çok daha net bilgiler sağlar.

Toksik etkinin belirlenmesinde üzerinde durulması gerektiği belirtilmekle beraber, Çizelgede CMC değerleri bulunmamaktadır. Ayrıca sunulan tezin materyalini oluşturan *P. reticulata* ve SLS hakkında da veri yoktur, ancak SLS'nin bu türdeki LC_{50} değeri ortalama 16 mg/L ± 1,965 olarak verilmektedir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4 Balıklarda SLS için belirlenen akut toksisite değerleri.[1]

Balık Türleri	Ortalama LC_{50} değerleri (mg/L)
Atherinops affinis	1,880
Carassius auratus	28,400
Channa punctata	20,975
Cichlasoma nigrofasciatum	23,767
Cirrhinus mrigala	856,700
Cyprinodon variegatus	7,000
Cyprinus carpio	33,044
Danio rerio	11,916
Fundulus heteroclitus	5,600
Fundulus similis	4,633
Gambusia holbrooki	15,100
Gasterosteus aculeatus	5,700
Heteropneustes fossilis	13,238
Jordanella floridae	9,050
Lepomis macrochirus	4,500
Leuciscus idus melanotus	22,000
Menidia beryllina	2,220
Menidia menidia	2,800
Mystus vittatus vittatus	1,577
Nothobranchius guentheri	40,000
Oncorhynchus mykiss	14,490
Oryzias latipes	47,923
Pimephales promelas	7,043
Poecilia reticulata	16,000
Rasbora daniconia	6,562
Sparus aurata	6,100

Bütün bu karşılaştırmaların genel sonucu, sürfaktanların balıklar üzerindeki etkilerinin çok farklı açılardan ve çok daha dikkatle değerlendirilmesi gerektiğidir.

Çevreye karışan tüm kimyasallar gibi deterjanlar ve sürfaktanlar da, balıklar ve diğer tüm canlılarda vücut yüzeyleri ile solunum ve sindirim sistemleri üzerinden vücuda girerek toksikokinetik ve toksikodinamik süreçlerde farklı doku, organ ve sistemlerde birçok yapısal ve fizyolojik değişime yol açarlar. Bu maddelerin vücuttan atılabilmeleri veya zararsız hale getirilebilmeleri, yani homeostazisin tekrar sağlanabilmesi için çok farklı savunma mekanizmalarının devreye sokulması ve fazladan enerji harcanması gerekir. Yabancı maddelerin doğal çevredeki davranışı ilk planda biyofizikokimyasal özellikleriyle belirlenir. Etkilerin ortaya konabilmesi ve gerekirse önlem alınabilmesi için de farklı canlı

[1] *(http://www.pesticideinfo.org/)*

türleri kullanılarak çok değişik araştırmalar yapılabilir. Böylesi araştırmalarda balıklar, besin zincirindeki yerleriyle her zaman ilgi çeken canlılardır ve maruziyet yolu açısından bakıldığında, bu canlıların sucul ortamdaki bütün kimyasallara, tüm vücut yüzeyleri ve solungaçlar üzerinden maruz kalacakları açıktır. Maruziyet sonucunda solungaç epitelinde ve deride oluşacak histopatolojik değişimler başta solunum işlevleriyle su-tuz dengesini, dolayısyla tüm metabolik süreçleri değiştirecektir (Rosas et al., 1988). Üstelik enzimler üzerinden çalışan savunma ve onarım mekanizmaları balıklarda yüksek omurgalılarda olduğu kadar iyi gelişmiş değildir. Bir diğer deyişle, bu en alt omurgalı grubu sadece maruziyet yüzeylerinin genişliğiyle değil, sınırlı savunma olanaklarıyla da büyük tehdit altındadır.

Deterjan ve sürfaktanların balıklar üzerindeki etkileri öncelikle ilk maruziyet yüzeyleri olarak epidermis (Pohla-Gubo and Adam, 1982; Garg and Mittal, 1993; Mittal and Garg, 1994) ve solungaçlarda araştırılmıştır (Ribelles et al., 1995a; Brunelli et al., 2008). Anyonik bir deterjan olan dodeksil benzen sodyum sülfonat, *Rita rita*'da solungaç epiteli ve mukus hücrelerinin yağ ve protein içeriklerinde azalmaya yol açmaktadır (Roy, 1988). İlk ve en geniş maruziyet yüzeyleri çerçevesinde tat tomurcukları ve koklama duyusuna ait yapılar da incelenmiştir (Bardach et al., 1965; Cancalon, 1983a; Zeni and Caligiuri, 1992; Zeni et al.,1995; Zeni and Stagni, 2002). Solunum fizyolojisini değiştiren deterjanların eritrositler üzerindeki etkileri ilgi çekmiş (Bielinska and Terlecki, 1984); bu doğrultuda sodyum alkil benzen sülfonatın kan hücrelerinde oluşturduğu bazı elektrokimyasal değişimler rapor edilmiştir (Byrne et al., 1989). Hem dolaşım sistemi üzerinden oluşacak metabolik etkilerle, hem de savunma mekanizmalarının çalıştırılmasıyla tüm enerji dengelerinin değişmesi beklenebilir bir sonuçtur. Nitekim subletal deterjan konsantrasyonlarına maruz kalan *Ctenopharynqodon idella*'da enerji dengesinin değiştiği gözlenmiştir (Rosas et al., 1988).

Deterjanların karaciğer, dalak, böbrek, pankreas, bağırsak gibi organlarda oluşturdukları değişimler farklı balık türlerinde geniş biçimde incelenmiştir. *Sparus aurata* türünde SLS'in bağırsak (Ribelles et al., 1995b), karaciğer ve pankreas (Ribelles et al., 1995c) ve solungaçlar (Ribelles et al., 1995a) üzerine

biyolojik etkilerinin incelendiği çalışmada SLS'nin LC_{50} değeri belirlendiği; bununla birlikte yüksek konsantrasyonlara uzun süreli maruziyetin bağırsak dokusunda doku yıkımına ve biyomakromoleküllerin değişimi sonucu ölüme yol açtığı, karaciğer ve pankreas işlevlerini etkileyen karbohidrat ve proteinlerde değişim izlendiği ve solungaçta maruziyetin uzunluğuna bağlı olarak ciddi morfolojik zararların görüldüğü, protein ve karbohidrat moleküllerinde değişimlerin izlendiği bildirilmiştir. Yine aynı türde SLS'nin böbrek ve dalak üzerindeki değişimlerini ele alan çalışmada ise böbrekte normal yapının başta renal korpüskül ve tübüllerde büzülme gibi nedenlerden dolayı bozulduğu, dalakta ise lökositlerde hızlı bir artış ile beraber infiltrasyonun izlendiği bildirilmiştir (Rosety et al., 1997). Tensioaktif özellik taşıyan alkil benzen sülfonatın (ABS) *Sparus aurata* türünde genç bireylerinin hayatta kalma oranlarıyla beraber karaciğer ve bağırsak dokuları üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışma da, karaciğer dokusunu oluşturan hepatositlerin ışınsal düzenlenişinde ve bağırsakda villüslerde bozulmalar, bağırsak katmanlarında incelmeler izlenmiş ve protein karbohidrat miktarlarında değişimler tesbit edilmiştir. Tüm bu değişimler konsantrasyona bağlı olarak artış göstermekte ve genç bireylerin gelişiminde kalıcı zararlara yol açmaktadır (Rosety et al., 2001a).Ayrıca iki farklı anyonik deterjanın etkilerinin kıyaslandığı çalışmalarda mevcuttur. Örneğin anyonik deterjanlardan LAS ile SLS'nin *Sparus aurata*'da döllenme kapasitelerini nasıl etkilediği üzerine yapılan çalışmada LAS'ın daha zararlı olduğu belirlenmiştir. (Rosety et al., 2001b). *S. aurata* türünün yumurtaları üzerinde ABS ile SLS etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada ise; SLS'nin başlangıçta yüksek konsantrasyonlarda ABS'den altı kez daha toksik etki gösterdiği düşünülse de, istatistiksel incelemeler iki anyonik sürfaktan arasında önemli bir fark olmadığını göstermiştir. Bu araştırmada ayrıca yumurtaların içeriğindeki yağ miktarının SLS uygulamasında sonra azaldığı belirtilmiştir (Rosety et al., 2001c). SLS'nin böbrekte histopatolojik etkilerinin incelendiği *Scophthalmus maximus* türünün diğer teleost türlerine kıyasla daha dirençli olduğu ve bunun bentik alanlarda yaşamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Böbrekte izlenen histopatolojik değişimler arasında vakuolizasyon yanısıra epitel hücrelerinde deskuamasyon ve glomerulus ile tübüllerde dejenerasyon yer almaktadır (Rosety-Rodríguez et al., 2002).

Kimyasalların oluşturduğu çevresel stres sinir sistemini de etkilemektedir, deterjanlar balıkların periferal sinir reseptörleri üzerinden hareket, beslenme ve termoregülasyon işlevlerini bozabilirler (Alcaraz et al., 1993). Ayrıca üreme sisteminde de önemli değişimler oluşturabilirler, örneğin östrojen reseptörlerine bağlandığı uzun zaman önce bildirilen (Mueller and Kim, 1978) 4-alkil fenol bileşiklerinin endokrin bozucu nitelikleri sonraki yıllarda *in vitro* ve *in vivo* araştırmalarla kanıtlanmıştır (Soto et al., 1991; Jobling et al., 1996; Ying, 2006). Östojen üzerinden gerçekleşen değişimler populasyon dengelerini değiştirecek boyutlara da ulaşabilir. İngiltere'nin kontaminasyon oranı yüksek nehirlerinde APE gibi deterjanların indirgenmesiyle oluşan alkil fenol formları olan NP ve OP konsantrasyonları balıkların üreme sağlığını etkileyecek kadar fazla bulunmuştur (Jobling et al., 1996). Östrojeni taklit eden bu bileşikler erkek balıklarda feminizasyona yol açmakta ve vitellogenin üretimini tetiklemektedir (Pedersen et al., 1999). Özet olarak, deterjanlar değişik balık türlerinde birçok olumsuz etkiye yol açmakta, üstelik bu etkiler sedece doku-organ ve sistemlerle belirlenen bireysel düzeyde kalmayıp populasyon düzeyine kadar uzanmaktadır.

Deterjan etkin maddeleri olarak sürfaktanlara gösterilen ilgi, son yıllarda kapsamlı derlemelerin yayımlanmasıyla artmıştır (Cserhati et al., 2002; Ying, 2006; Chaturvedi and Kumar, 2010; Ivankovic and Hrenovic, 2010; Könnecker et al., 2011). Subletal surfaktan konsantrasyonları öncelikle deri ve solungaç epitelinde yağ içeriğinin değişimine ve mukus üretimini etkileyerek hasara yol açar. Bu maddelerin genel etki mekanizmaları yüksek biyolojik aktiviteleriyle bağlantılıdır. Anyonik olanlar peptidler, enzimler ve DNA gibi biyoaktif makromoleküllere bağlanabilirler. Bağlandıkları peptid ve proteinlerin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarını, yani tüm katlanmalarını ve molekülün yüklerini değiştirebilirler. Bu da biyolojik işlevin değişmesine, bozulmasına neden olur. DNA eklentisi oluşturmaları geridönüşsüz hasarlara yol açabilir. Katyonik sürfaktanların birincil hedefi sitoplazmik iç zarlardır. Noniyonik sürfaktanlar da zarlara bağlanarak zar geçirgenliğini artırır. Artan geçirgenlik iyon kaybı nedeniyle aminoasitlerin zarar görmesine, böylece hücre ölümüne yol açabilir.

Sunulan tezin kimyasal materyalini oluşturan SLS, LC_{50} değerlerine göre balıklar için toksik olarak sınıflandırılmalıdır (OECD, 1992). *P. reticulata* için

LC_{50} değeri yukarıda da vurgulandığı üzere ortalama 16 mg/L arasındadır (http://www.pesticideinfo.org/List_AquireAcuteSum.jsp?Rec_Id=PC35205&Taxa_Group=Fish-2015).

Jüvenil *Dicentrarchus labrax* örneklerinde ortalama 7,34 mg/L EC_{50} değeri ile toksik etkiler gösterir. Jüvenil *Oncorhynchus mykiss* örneklerinde LAS'ye oranla daha az toksik etki oluşturduğu kaydedilen (Buh and Hamilton, 2000) SLS'nin yüzme kapasitesi ve gelişimi olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Barbieri et al., 1998; Rocha et al., 2007).

Ulaşılabilen kaynaklarda, sunulan tezin canlı materyalini oluşturan *P. reticulata*'da; çok ilginç bir yapılaşma olan baş böbreği üzerinde SLS etkilerini belirlemeye yönelik herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla önce bu teleost türü, sonra da baş böbreği hakkında aşağıda verilecek olan ayrıntılı bilgiler, bu noktaya dek verilen genel değerlendirmelerle birlikte ele alınmalıdır.

1.3 Bir Model Organizma Örneği: *P. reticulata*

Daha önce de belirtildiği üzere kemirgenler, özellikle toksikolojik ve farmakolojik araştırmalar ile modelleme çalışmalarında klasik olarak tercih edilen omurgalılardır. Sadece karasal omurgalıları değil farklı çevre fazlarında yaşayan omurgasız ve omurgalı türlerini de kapsayan ekotoksikolojik araştırmalarda ise alternatif ve özel konum küçük tatlı su balıklarına aittir. Bu canlılar kısa yaşam döngüleriyle, bakımlarının kolay ve ekonomik olmasıyla ve kısa sürede, çok sayıda yavru vermeleriyle ideale yakın çalışma materyalleridir.

Sayılan bütün avantajları taşıyan *P. reticulata* davranış, moleküler evrim, gelişim biyolojisi, populasyon genetiği ve kanser araştırmalarında kullanımı giderek yaygınlaşan bir model organizmadır (Khoo et al., 1999; Nakajima and Taniguchi, 2001; Reznick et al., 2001; Dahm and Geisler, 2006; Gerhard, 2007; Shaddock, 2009; Roy et al., 2013).

Bilindiği üzere çeşitli kimyasal maddelerin etkilerinin belirlenmesinde, özellikle subletal konsantrasyon deneyleri yapılarak histolopatolojik parametrelerin kullanılması çok yaygın bir uygulamadır (Wester et al., 2002; Van

Der Ven et al., 2003; Troncoso et al., 2012). Bir başka ifadeyle histopatolojik değerlendirmeler, toksik maddelerin etki mekanizmalarının ortaya konmasında altın anahtarlardır (Bernet et al., 1999; Wester et al., 2002; Hawkins et al., 2003; Camargo and Martinez, 2007; Agamy, 2012; Hued et al., 2012).

Poecilia türlerinde çeşitli maddelerin etkileriyle oluşan değişimlere ilişkin olarak ulaşılabilen raporlardan en eski tarihli olanı Woodhead et al. (1977) tarafından *P. formosa*'da bazı doku değişimlerinin araştırıldığı çalışmadır. Sonraki yıllarda uzun süreli beta-hekzaklorosiklohekzan maruziyetinin *P. reticulata*'daki histopatolojik etkileri incelenmiş (Wester et al., 1985) ve aynı yöntemlerin kullanıldığı araştırmalar farklı konulara yayılarak artış göstermiştir. Örneğin metil bromid ve sodyum bromid maruziyetleri *P. reticulata* ve *Oryzias latipes* türlerinde karşılaştırılarak ele alınmıştır (Wester et al., 1988). Özellikle gemicilik sektöründe yaygın olarak kullanılan, toksisiteleri çok yüksek olan iki farklı tributiltin bileşiğinin *P. reticulata*'daki etkileri Wester and Canton (1987) tarafından ortaya konmuş, bu çalışmayı aynı bileşiklerin etkilerine dair *O. latipes* türüyle yapılan karşılaştırmalı bir diğer inceleme izlemiştir (Wester et al., 1990). Yine çok toksik bir kimyasal olan metil cıva kloridin histopatolojik etkileri de araştırılmıştır (Wester and Canton, 1992). *P. reticulata*, bazı varyasyonların genetik temelini belirlemeye yönelik çalışmalar (Khoo et al., 1999) ile doğal populasyonlardaki yaşlanma süreçlerine dair araştırmalarda (Reznick et al., 2001); yani kalıtım, populasyon dinamiği ve evrim gibi farklı alanlarda da materyal olarak kullanılmıştır.

Son yıllarda ekotoksikolojik açılımlar atık bertarafından kanserojenlere, biyolojik işaretleyicilerden endokrin engelleyicilere… doğru sürekli genişlemekte, bu oldukça dayanıklı türün kullanım sıklığı da giderek artmaktadır. Örneğin Larsonn et al. (2002), *P. reticulata*'da kağıt hamuru maruziyetiyle oluşan maskülinizasyon, zehirsizleştirme ve oksidatif stres süreçlerini incelemişlerdir. Ayrıca pankreas ve karaciğer kanserlerine ilişkin araştırmalar uzantısında (Fournie and Hawkins, 2002; Wolf and Wolfe, 2005); kanserojenik maddelerin belirlenmesine yönelik testlerde *O. latipes* ile birlikte *P. reticulata*'nın materyal olarak kullanımı da gündeme getirilmiştir (Hawkins et al., 2003).

P. reticulata kanser gibi yaşamsal konuların yanısıra üreme sistemi çalışmalarında da karşımıza çıkmakta; yukarıda da not edildiği üzere laboratuvar koşullarında kolayca üretilebilme niteliği ile örneğin oktilfenol ve 17-β östradiol gibi maddelerin gonadlar ve embriyolar üzerindeki doğrudan ve dolaylı etkilerinin değerlendirilmesi (Kinnberg et al., 2003), bir başka deyişle endokrin engelleyicilerin çalışma mekanizmaları açısından da (Wester et al., 2004) çok uygun çalışma koşulları sunmaktadır.

Söz konusu tür son yıllarda pestisitlere ilişkin çalışmalarda da kullanılmaktadır. Bu çerçevede Sharbidre et al. (2011) tarafından metil paratiyon ve klorpirifos olarak iki farklı pestisitin değişik dokulardaki biyoişaretleyiciler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Güneş ve Sedat (2011) ise bir diğer pestisitin, deltametrinin lipaz aktivasyonundaki etkilerini rapor etmişlerdir.

Metal etkilerini belirlemeyi amaçlayan çalışmalar uzantısında, bakır sülfat gibi bazı metal tuzlarının (Park and Heo, 2009), bakır ve kadmiyumun (Shuhaimi-Othman et al., 2010) ayrıca diğer bazı metallerin (Shuhaimi-Othman et al., 2013) *P. reticulata* üzerinde oluşturduğu etkilere dair raporları; kompozitlerin etkilerine yoğunlaşan çalışmalar izlemiştir (Roy et al., 2013). Bu son araştırmalarda, söz konusu türün model oluşturma özelliği üzerinde önemle durulmaktadır.

Genel bir değerlendirmeyle *P. reticulata* üzerindeki çalışmaların genişlediği ve arttığı, modelleme yaklaşımlarında önemli bir yol alındığı ortadadır. Ancak en iyi bilinen ve sayılamayacak kadar çok araştırmada model organizma olarak kullanılan balık türü elbette ki zebra balığı, *Danio rerio*'dur. Bu çerçevede hemen kaydetmek gerekir ki, genomu başta olmak üzere tüm özellikleri gayet iyi bilinen bir organizmayla çalışmak gerçekten büyük bir konfor ve her anlamda tasarruf sağlar. Ancak bu kolaylıkların ciddi bir bedeli vardır: Hep aynı tür üzerinde çalışıldıkça biyolojik çeşitliliğin doğal uzantısı olan farklılıklar ister istemez gözardı edilir ve değerlendirilemez. Böylece veri tabanlarında sadece belli türlerden sağlanan bilgiler dengesiz bir ağırlık kazanır. *P. reticulata,* sunulan çalışmada bu yaklaşımdan hareketle, daha az çalışılmış bir tür olarak özellikle seçilmiş ve veri tabanlarının çeşitlendirilerek genişletilmesi hedeflenmiştir. Baş böbreği yapısına dair araştırmalar için de aynı yaklaşım söz konusudur.

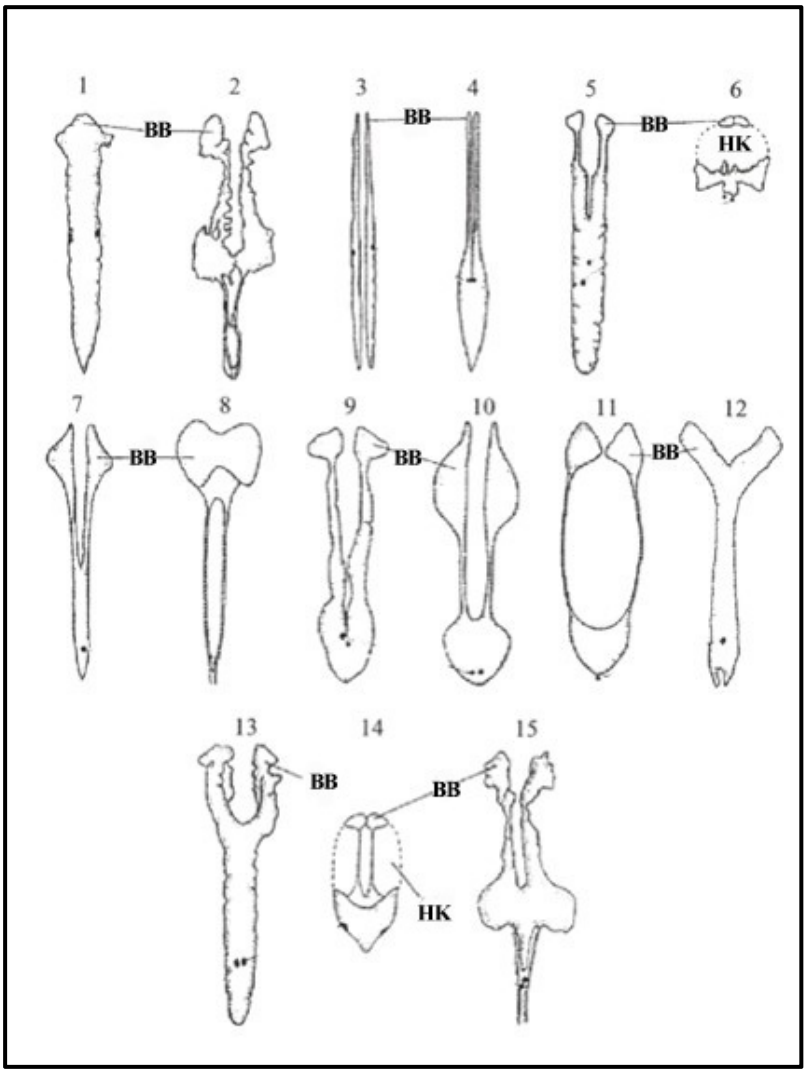
1.4 Teleostlarda Böbrek ve Baş Böbreği

Teleostlarda embriyonik gelişim sırasında işlevsel olan pronefroz böbrek Petromyzontiformes'de metamorfoz esnasında, kıkırdaklı balıklarda ise oluşumundan hemen sonra dejenere olsa da; Myxiniformes, Dipnoi, Holostei ve Teleostei'nin büyük bir çoğunluğunda ergin formlarda yapısal olarak muhafaza edilir (Demir, 2009).

1.4.1 Böbrek: genel bilgi

Erişkinlerde işlevsel böbrek mezonefrozdur ve üç farklı kısımdan oluşur. Bunlar özofagusun dorsal ve bilateral bölgesindeki baş böbreği, tatlı su balıklarında çok iyi gelişmiş renal tübüllerden ibaret gövde böbreği ve opistonefrozun kaudal kısmında yerleşen ve esas renal işlevlerden sorumlu olan, ancak bazen az gelişmiş ya da kaybolmuş olduğu izlenen kuyruk böbreğidir (Hoole, 2001; Gallo and Civinini, 2003; Kobelkowsky, 2013).

Şekli türden türe büyük farklılıklar gösterebilen (Şekil 1.2); memelilerde olduğu gibi bir korteks-medulla organizasyonu izlenmeyen böbreğin histolojik yapısı, hematopoetik dokuyla çevrelenip sarılan nefronlardan ve organ boyunca dağılmış halde lenfoid dokudan ibarettir. Yapısal düzenlemede gelişim ve kısımların kapladıkları alan bağlamında önemli farklılıklar gözlenebilir, ancak temelde yüksek omurgalılarda olduğu gibi glomerulus ve tübüllerle toplama kanallarından oluşur. Değişik çevresel özelliklere gösterilen uyum uzantısında, proksimal ve distal tübüllerde segmentasyon da türden türe değişebilir (Reimschuessel, 2001).



Şekil 1.2 Bazı teleost türlerinde böbreğin ventraden görünümü. Baş böbreği (BB), Hava Kesesi (HK). 1. *Oncorhynchus mykiss;* 2. *Cyprinus carpio;* 3. *Misgurnus anguillicaudatus;* 4. *Anguilla japonica;* 5. *Channa argus;* 6. *Plotosus anguillaris;* 7. *Niphon spinosus;* 8. *Prionurus microlepidotus;* 9. *Pterois lunulata;* 10. *Lepidotrigla microptera;* 11. *Hoplobrotula armata*; 12. *Paralichtys olivaceus;* 13. *Carassius auratus;* 14. *Parasilurus asotus;* 15. *Hexagrammos otakii* (Gallo and Civinini, 2003'den değiştirilerek)

Teleostlarda böbreğin temel görevi olan boşaltımın yanısıra hematopoetik işlevlerinin de olduğu uzun zamandan beri bilinmektedir (Fijan, 1961). Farklı kan hücrelerinin, sunulan araştırmada da esas olarak alınan başlıca gelişim aşamaları detaylı olarak verilmiştir (Kondera, 2011).

Bu bilgilere rağmen balıklarda hematopoetik dokular, kök hücreler ve öncül hücrelerin yapısal ve işlevsel niteliklerine dair raporlar çok da fazla değildir. Diago et al. (1998) *Onchorhyncus mykiss*'den elde edilen pronefrik stromal hücre hattında hematopoezise ilişkin bazı indüklemeler yapmışlardır. *Carassius auratus langsdorfii*'de yapıları detaylarıyla belirlenen hematopoetik kök hücrelerin (Kobayashia et al., 2006) ayrıca böbrekten izole edildiği de bildirilmiştir (Kobayashia et al., 2007). *Ictalurus punctatus*'da ise kan hücre hatlarının yapısal nitelikleri ile başlıca hematopoetik bileşenler ayrıntılı olarak incelenmiştir (Fijan, 2002a, b). Hematopoezis hakkında üzerinde en fazla araştırma yapılan tür beklenildiği üzere *D. rerio*'dur. Bu türde hematopoesizin hem hücre tipleri hem de süreci denetleyen genler açısından memelilere büyük ölçüde benzediği bilinmektedir (Song et al., 2004; Berman et al., 2005; Qian et al., 2007; Ivanovski, et al., 2009; Soza-Ried et al., 2010). Söz konusu süreç *Cyprinus carpio'*da da ayrıntılı olarak ele alınmıştır (Kondera, 2011).

1.4.2 Baş böbreği

Bazı türlerde sadece pronefroz böbreğin; bazı türlerde ise buna ek olarak mezonefroz böbreğin anteriöründeki tübüllerin dejenerasyonu ile oluşan; tüm böbrek yapısının yaklaşık 1/3'ünü kaplayan baş böbreği, kraniyal böbrek veya anteriör böbrek olarak da isimlendirilir (Reimschuessel, 2001). Farklı türlerdeki şekli ve konumu değişkendir (Şekil 1.2). Genel anlamda hematopoetik-lenfoid doku içerisine gömülü renal korpüsküller, toplayıcı tübül ve kanallardan oluşan boşaltım elemanları ve bazı endokrin hücrelerle; çok farklı görevler üstlenen karmaşık ve ilginç bir yapılaşmadır (Meseguer, et al., 1991; Esteban and Meseguer, 1994; Fishelson, 1996).

Hematopoetik doku sinüzoidleri çevreleyen hematopoetik hücreler ile bunları destekleyen, güçlükle ayırt edilen retiküler hücre ve fibriller ile makrofajlardan ibarettir. Bu dokuyla karışmış haldeki lenfoid dokuda memelilerde gözlenen trabeküller ile korteks-medulla; kırmızı pulpa-beyaz pulpa ayrımı yoktur, doku bu haliyle daha çok memelilerdeki lenf düğümlerine benzer. Baş böbreğinde ayrıca, özellikle post kardinal vena ve dallarının çevresinde, hematopoetik-lenfoid doku içerisinde gömülü, bazen adacıklar oluşturan

interrenal hücreler ile genellikle gruplaşmayan kromaffin hücreler de bulunur. Hatta *Cyprinus carpio*'da baş böreğinde tiroid foliküllerinin de yer aldığı bildirilmiştir (Qureshi and Sultan, 1976). İnterrenal hücreler kortizol ve kortikosteroidler ile aldosteron salgılar; kromaffin hücrelerin salgıları ise katekolaminlerdir. Myxiniformes'de endokrin işlevlerine dair bilgi yoktur, ancak hematopoetik ve lenfoid işlevleri bulunduğu bilinir (Bennett**,** et al., 2001; Fishelson, 2006).

Bu genel tanımlardan da izlendiği üzere teloestlarda baş böbreği tartışmalı olmakla birlikte boşaltım sisteminde; tartışmasız biçimde de kan hücreleri yapımında ve bağışıklık-savunma sisteminde; glukokortikoid özellikli salgısıyla protein, lipid ve karbohidrat metabolizmasında; kortikosteroid yapısındaki salgısıyla da steroid metabolizmasında farklı görevlere sahiptir.

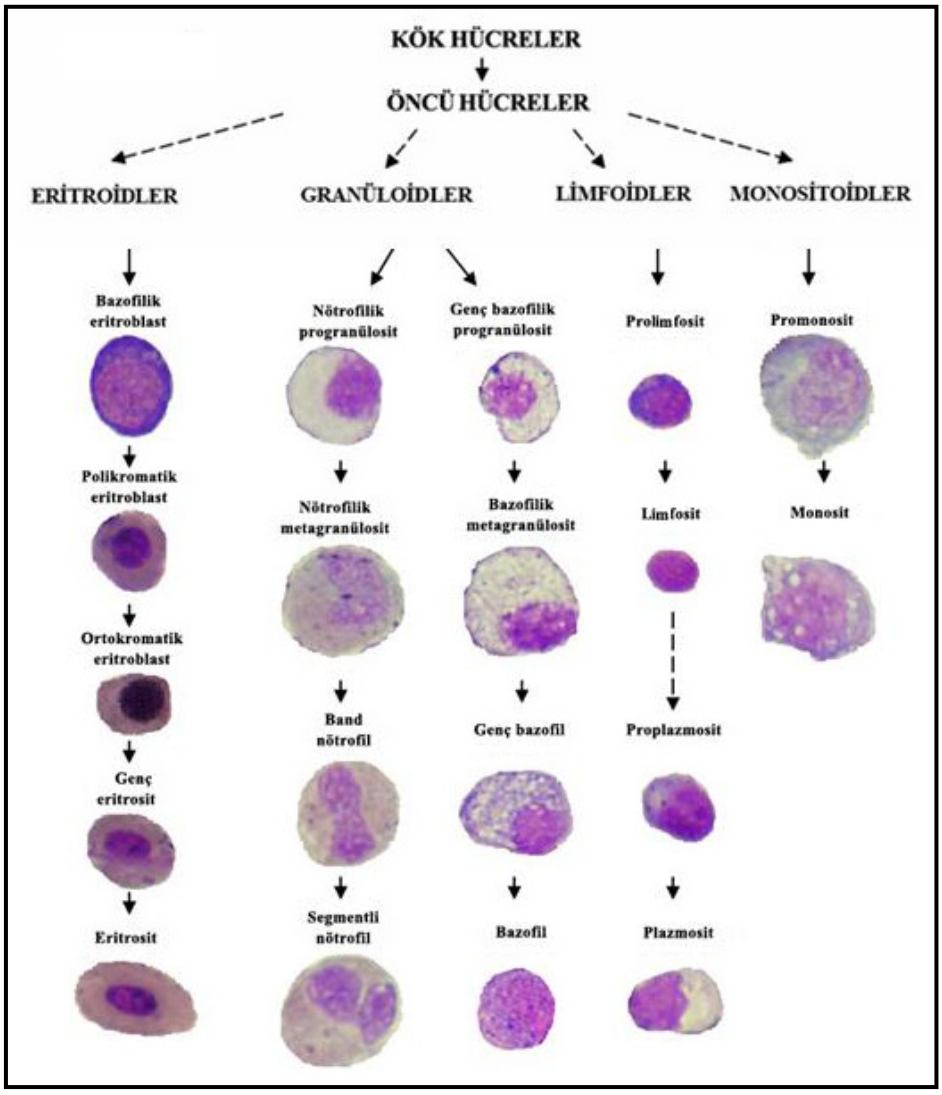
1.4.3 Baş böbreğinin işlevleri

Baş böbreğinin ontolojik olarak pronerfroz böbrek ile mezonefroz böbreğin önünde yer alan tübüllerin dejenerasyonu ile oluştuğu konusunda uzlaşma varken, boşaltım işlevleri hakkında çok fazla bilgi yoktur. Cichlidae familyasına ait türlerle ilgili ontolojik çalışmada bu tartışmanın larval aşamaların yeterince incelenmemesinden kaynaklı olabileceğine değinilmiştir (Fishelson, 1996). Apogonidae familyası üyelerinde de Cichlidae familyasına ait türlerde olduğu gibi baş böbreğinde de renal korpüsküller, toplayıcı kanal ve tübüllerin gözlenmesi (Fishelson, 2006) bu yapının boşaltım görevleri olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Baş böbreğinin boşaltım görevinin de bulunduğu bildirilen *Apogon cookii*, *Cheilodipterus lineatus*, *Apogon annularis, Melanochromis auratus, Oreochromis mossumbicus*, *Surotheroden galilueus* ve *C. carpio* gibi türlerde Bowman kapsülü ve glomerulusla tipik renal korpüskül yapısı izlenmektedir (Hoole, 2001; Fishelson, 2006). Ancak renal korpüsküllerin gövde böbreğinde çok daha fazla sayıda bulunduğu bir gerçektir. Toplayıcı tübül ve kanallarda da herhangi özel bir durum gözlenmez.

1.4.3.1 Kan yapma işlevleri (hematopoetik işlevler)

Teleost hematopoetik dokularında eritrosit, granülosit, lenfosit ve monositlerin gelişim aşamaları Şekil 1.3'de izlenmektedir. Karmaşık hematopoetik organizasyonuyla baş böbreği, yüksek omurgalıların kemik iliği ile analogdur (Meseguer et al., 1990; Ivanovski, et al., 2009; Kondera, 2011).



Şekil 1.3 Balıklarda farklı hematopoetik süreçlerdeki hücrelerin şematik gösterimi (Kondera, 2011'den değiştirilerek).

Baş böbreğinin hematopoetik işlevlerine yönelik araştırmalar birkaç türle sınırlıdır. *Dicentrarchus labrax*'da eritropoezis ve trombopoezis (Esteban et al., 1989) ile granülopoezis süreçlerinde baş böbreğinin ince yapı özellikleri ortaya konmuştur (Meseguer et al., 1990). Bu türde ayrıca stroma hücreleri, makrofajlar ve lenfoid hücrelere ilişkin yine ince yapı gözlemleri de rapor edilmiştir

(Meseguer et al., 1991). Soğuk sularda yaşayan iki teleost türünde, *Trematomus bernacchii* ve *Chionodraco hamatus*'da baş böbreğinde lenfomiyeloid hücrelerinin yapıları belirlenmiştir (Romano et al., 2002). *Oreochromis niloticus*'da baş böbreğinin hematopoezis sürecindeki yapısal özellikleri ışık ve elektron mikroskobuyla incelenmiştir (Abdel-Aziz et al., 2010b). Hematopoetik süreç *Cyprinus carpio'*da yine morfolojik anlamda değerlendirilmiştir (Kondera, 2011).

Kan yapım süreçlerinde çevresel etkenlerin ele alındığı araştırmalar ise çok az sayıdadır. Peters and Schwarzer, (1985) stres altındaki *O. mykiss* örneklerinde hematopoetik dokuda oluşan değişimleri incelemişlerdir. Subletal konsantrasyonlarda amonyak maruziyeti sonucunda *C. carpio* kan hücreleri ve hematopoetik dokularında oluşan değişimler Wlasow and Dabrowska (1989) tarafından ortaya konmuştur. *C. carpio'*da ayrıca, kadmiyum ve bakır uygulamaları sonucunda hematopoetik potansiyelin azaldığı bildirilmiştir (Kondera and Witeska, 2013).

Hematopoezisde farklı serilerdeki hücrelerin gelişim ve olgunlaşma aşamaları da farklıdır.

Eritrositlerin Gelişimi: Diğer kan hücreleri gibi eritrositler de blast olarak tanımlanan, olgunlaşmış hücrelere göre daha büyük, yuvarlak ve oval şekilli, oldukça iri nukleuslu hücrelerden köken alırlar. Hematopoetik dokuda bulunma oranları %2-%3 arasında olan blastlar (Kondera, 2011) diğer hücre serilerine göre daha sık rastlanan eritrosit serileri için öncül hücreler olan eritroidleri oluşturur. Eritroidlerin hematopoetik dokuda bulunma yüzdeleri *O. mykiss* ve *C. carpio* türlerinde %37-%45 olarak verilmiştir (Peters and Schwarzer, 1985; Wlasow and Dabrowska, 1989). *Ictalurus punctatus* (Fijan, 2002a) ve yine *C. carpio* (Kondera, 2011) için verilen değerler ise %13-%14 olarak daha düşüktür.

Eritrosit farklılaşma ve olgunlaşma evreleri hücrelerin şekil ve boyanma özelliklerinde, nukleus büyüklüklerinde ve kromatin dağılımlarındaki değişimlerle ayırt edilir (Fijan, 2002a; Qian et al., 2007; Carradice and Lieschke, 2008; Abdel-Aziz et al., 2010b). Olgunlaşma sürecinde temel ayırıcı nitelik, sitoplazmanın

koyu bazofilikten asidofiliğe doğru geçişim gösteren boyanma özelliğidir. Hücre büyüklükleri polikromatik eritroblast aşamasına doğru dereceli olarak azaldıktan sonra yeniden artmaya başlarken, nukleus büyüklüğü derece derece azalmaktadır (Fijan, 2002a; Kondera, 2011).

Farklı aşamalardaki hücreler için ayrıntılar da verilebilir: Genel anlamda blastlardan daha küçük olan koyu bazofilik eritroblastların merkezde yerleşmeyen, çok büyük nukleusları adeta granüler görünümlüdür. Sonraki aşamayı temsil eden ve gri-mavi tonlarda boyanan, şekilleri gitgide yuvarlaklaşan, önceki aşamaya göre oldukça küçülen nukleusları yine granüler görünen polikromatik eritroblastlara çok sık rastlanır. Ortokromatik eritroblastlar açık kırmızı tonlarda boyanır, yuvarlak nukleusları çok daha yoğun görünümlüdür. Nukleus rengi genç eritrositlerde belirgin olarak açılmış, granüler görünüm de kaybolmuştur. Olgun hücreler ve nukleusları uzamış şekillidir, sitoplazma yoğun kırmızı renkte boyanmaktadır (Şekil 1.3).

Eritropoezis aşamaları *D. labrax* (Esteban et al., 1989) *Sparus aurata* (Zuasti and Ferrer, 1989), *Oreochromis niloticus* (Homechaudhuri, 2001; Abdel-Aziz et al., 2010b) ve *C. carpio* (Homechaudhuri, 2001) türlerinde genelde birbirine benzerdir. Terminolojik bazı farklılıklar tartışma bölümünde kaydedilecektir (Fijan 2002a; Abdel-Aziz et al., 2010b; Kondera, 2011).

Granüllü Lökositlerin Gelişimi: Balıklarda granülopoetik serilerin ilk aşamasındaki miyeloblast hücreleri ışık mikroskobu ile genelde ayırt edilemez (Kondera, 2011; Kondera and Witeska, 2013). Baş böbreğinde gerçekleşen granülopoesiz sürecinin yüksek omurgalılardakine büyük ölçüde benzediği bilinmektedir (Meseguer et al., 1990; Bennett et al., 2001; Hsu et al., 2001; Berman et al., 2005; Carradice and Lieschke, 2008; Kondera, 2011). Ancak memelilerde nötrofil, bazofil ve eozinofil olarak gruplandırılan granüllü lökosit serilerinin *D. labrax* (Meseguer et al., 1990); *D. rerio* (Carradice and Lieschke, 2008); *O. niloticus* (Abdel-Aziz et al., 2010b); *Ictalurus punctatus* ve *C. carpio* türlerinde (Fijan, 2002a; Kondera, 2011) bulunuş ve isimlendirmeleri farklıdır. Granülositlerin kökenlerine ilişkin belirsizliklere, granülositlerin değişik savunma işlevleri hakkında yanılgılara neden olabilecek bazı terminolojik tartışmalar

eklenmektedir (Fijan, 2002a, b; Travares-Dias, 2006; Flerova and Balabanova, 2013).

Nötrofil öncüllerinden farklılaşan nötrofilik progranülositler (Şekil 1.3) çok sık gözlenen büyük hücrelerdir. Açık mavimsi renkte boyanan sitoplazmalarında hücre zarına bitişik gibi gözlenen konumlanmış yuvarlak nukleusları hücrenin neredeyse yarısını kaplamaktadır. Olgunlaşma sürecindeki nötrofilik metagranülositlerde konumu değişmeyen, ancak kapladığı alan göreceli olarak azalan nukleusun rengi açılmaya başlar. İzleyen aşamalarda kromatinin giderek belirginleştiği nukleus önce bant şeklinde, sonra da iki ya da üç parçaya ayrılmış halde gözlenir (Wlasow and Dabrowska, 1989; Bennett et al., 2001; Lieschke et al., 2001; Fijan, 2002a, b; Scharsack et al., 2003; Abdel-Aziz et al., 2010b; Kondera, 2011).

Eozinofiller, teleostlarda özellikle evrim sürecindeki durumları çerçevesinde ciddi tartışmalara konu olan hücrelerdir. Ulaşılabilen kaynaklarda bu hücrelerin işlevlerini belirleyebilecek bir moleküler belirteç rapor edilmemiş; dolaşım kanında ve/veya böbrekte öncüllerinin izlenmediği bildirilmiştir (Lieschke et al., 2001; Berman et al., 2005; Travares-Dias, 2006). Bu nedenle Şekil 1.3'de eozinofillere ilişkin çizimler yer almamaktadır.

Bazofiller balıklarda dolaşım kanında ancak nadiren görülen hücrelerdir. Gelişim serilerinde (Bennett et al., 2001; Fijan, 2002a, b; Berman et al., 2005; Abdel-Aziz et al., 2010b; Kondera, 2011) izlenen progranülositler nötrofilleri oluşturanlara göre daha küçük, yine hücre zarına bitişik gibi izlenen nukleuslarında da kromatin daha yoğundur. Bazofilik, iri metagranülositlerde sitoplazma az sayıdaki granülle köpüksü-bulutsu bir görünüm sergiler, nukleusun konumu değişmemiştir. Nadiren izlenebilen genç bazofilik hücrelerde artan granül sayısı sitoplazmanın daha koyu renkte görünmesine yol açar, nukleus konumu öncekiler gibidir. Bu serinin en küçük hücreleri olan bazofillerde granüller tüm sitoplazmayı kaplamakta, üst üste yığılarak nukleus sınırlarını çok zor ayırt edilebilir hale getirmektedir (Şekil 1.3).

Granülsüz Lökositlerin Gelişimi: Lenfoidler teleost hematopoetik dokularında bol miktarda gözlenmektedir (Quentel and Obcach, 1992; Wlasow and Dabrowska, 1989; Romano et al., 1997; Willett et al., 1999; Fijan, 2002b; Liu et al., 2004; Kondera, 2011). Ancak baş böbreğinde bulunma sıklıkları sadece farklı türlerde değil, aynı tür içinde bile değişik verilmiştir (Wlasow ve Dabrowska; 1989; Fijan, 1961, 2002 a, b; Kondera, 2011).

Lenfosit farklılaşma serilerinde (Fijan, 2002a; Kobayashia et al., 2006; Kondera, 2011); koyu mavi-mor boyanan sitoplazmalarıyla gözlenen küçük prolenfositleri; nukleusun sitoplazmanın ¾'ünü kapladığı lenfositler izler. Bir sonraki aşamada değişken şekilli ve iri nukleusları hücre zarına yakın konumda gözlenen proplazmositler yer alır; bu arada sitoplazma rengi giderek açılmaktadır. Son evrenin hücreleri ise rengi iyice açık mavi-griye dönen sitoplazmalarında nukleusun yine kenarda konumlandığı plazmositlerdir (Şekil 1.3).

Monosit farklılaşma süreçlerinin kök hücreleri olan monoblastlar hematopoetik dokudaki diğer tüm hücrelerden daha büyüktür. Bunlar, önce baş böbreğinde bulunma yüzdeleri 0,95-1 arasında değişen monositoidlere ve sonra da sırasıyla promonosit ve monositlere dönüşürler (Fijan, 2002a; Kondera, 2011).

Trombositlerin Gelişimi: Trombositler, memelilerde analog oldukları kan pulcuklarının aksine nukleuslu, gerçek hücrelerdir ve kökenleriyle oluşum süreçleri de memelilerden farklıdır (Abdel-Aziz, et al., 2010b). Lenfositlere çok benzedikleri için ışık mikroskobunda çok zor ayırt edilirler (Esteban et al., 1989; Zuasti and Ferrer, 1989; Carradice and Lieschke, 2008; Abdel-Aziz et al., 2010b). Trombositlerin morfolojileri, işlevleri ve trombopoesizle ilgili çok az sayıda çalışma vardır (Travares-Dias, 2006; Abdel-Aziz et al., 2010b). Işık mikroskobuyla belirlenemeyen trombopoezis serileri için elektron mikroskobunda sadece protrombosit ile olgun trombosit ayrımı verilmektedir (Fijan, 2002a.b; Kondera, 2011).

Baş böbreğinin hematopoetik işlevlerine ilişkin olarak aktarılan tüm veriler, söz konusu karmaşık yapının kan hücreleri farklılaşma ve olgunlaşma

mekanizmalarındaki önemini vurgular niteliktedir. Baş böbreği bu mekanizmalar uzantısında bağışıklık tepkimelerinde de çok önemli görevler üstlenmiştir.

1.4.3.2 Bağışıklık sistemiyle ilgili işlevler (immün işlevler): Lenfoid doku ve melanomakrofaj merkezleri

Özgül ve özgül olmayan, kısaca gelişmiş bağışıklık tepkilerinin karakterize edildiği en alt omurgalı grupları Gnathostomia ve Teleostei'dir (Boehm and Bleul, 2007). Teleost bağışıklık sisteminin memelilerden en büyük farkı, kemik iliği ve lenf düğümleri olmayan bu alt omurgalı grubunda immün sistem elemanlarının böbrekte büyük yer tutmasıdır (Press and Evensen, 1999; Tort et al., 2003; Bromage et al., 2004; Zwollo et al., 2005; Zapata et al., 2006).

Teleost immün sisteminin gelişimi, yapısal ve işlevsel özellikleri detaylı raporlara konu olmuştur (Romano, 1998; Romano et al., 1997, 1998, 2002; Press and Evensen, 1999; Liu et al., 2004; Zwollo et al., 2005).

Başlıca lenfoid organlar olan timus, dalak ve baş böbreğinin ontolojik gelişimleri kıkırdaklı balıklardan *Polyodon spathula* (Peterman and Petrie-Hanson, 2006) ile kemikli balıklardan *Ictalurus punctatus* (Petri-Hanson and Ainsworth, 2001) *Thunnus orientalis* (Watts et al., 2003), *D. reiro* (Traver et al., 2003) *Hippoglossus hippoglossus* (Patel et al., 2009) türlerinde geniş olarak araştırılmıştır. Bu organların embriyonik gelişim sıralamalarının, deniz ve tatlı su türlerinde farklı olduğuna ilişkin yayınlar da vardır. *Salmo salar* (Ellis, 1977), *Harpagifer antarcticus* (O'Neill, 1989), *Pagrus minor*, *Paralichthys olivaceus*, *Seriola quinqueradiata* (Chantanachookhin et al., 1991), *Sparus aurata, Tilapia mossambica* (Josefsson and Tatner, 1993), *Scophthalmus maximus* (Padros and Crespo, 1996), *Gadus morhua* (Schroder et al., 1998), *Anarhichas minor* (Grøntvedt and Espelid, 2003), *Thumus orientalis* (Watts et al., 2003) ve *Siniperca chuatsi* (Tian et al., 2009) olmak üzere birçok deniz balığında; ontolojik gelişim sırasında baş böbreği timusdan öndedir. Ancak lenfoid organ niteliklerini timusdan daha sonra kazanmaktadır. Buna karşın yine bir deniz balığı türü olan *Dicentrarchus labrax* (Breuil et al., 1997) örneklerinde bu iki organın lenfoid niteliklerini eş zamanlı olarak kazandıkları bildirilir. Bu örnek dışında genelleme

yapılırsa, deniz teleostlarında bu üç lenfoid organın embriyonik gelişimi sırayla timus, baş böbreği ve dalak olarak verilir.

Tatlı su türlerinden *Barbus conchoniu* (Josefsson and Tatner, 1993), *C. carpio* (Botham and Manning, 1981), *O. mykiss* (Grace and Manning, 1980) ve *D. rerio*'da (Lam et al., 2004) yapılan araştırmalarla lenfoid organların deniz teleostlarından daha hızlı oluştuğu; ayrıca timus ve baş böbreğinin lenfoid niteliklerini eş zamanlı olarak kazandığı rapor edilmiştir.

Birincil lenfoid organın timus, ikincil organların da baş böbreği ve dalak olarak kabul edildiği raporlarda baş böbreği memelilerdeki lenf düğümlerine eşdeğer tutulmuştur (Hansen and Zapata, 1998). Ancak bu yapının son yıllarda netleşen hematopoetik işlevleriyle aslında kemik iliğine analog ve özellikle deniz balıklarında birincil lenfoid organ olduğu savunulmaktadır (Salinas et al., 2011; Zwollo, 2011; Kum ve Sekkin, 2011).

Diğer omurgalılar gibi teleostlarda da özgül ve özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinden, lenfoid dokuların retiküler stromasındaki hareketli ve hareketsiz hücre populasyonları sorumludur. Geniş sinüzoidler çevresindeki parenkimayı destekleyen stromada T ve B lenfositler, monositler, granülositler (özellikle nötrofiller), trombositler, mast hücreleri, sitotoksik hücreler ve makrofajlar yer alır (Romano et al., 1997; Press and Evensen, 1999; Zwollo et al., 2005).

Baş böbreğinde lenfopoezis sürecine yönelik immünohistokimyasal (Koumans-van Diepen et al., 1995; Davidson et al., 1997; Meloni and Scapigliati, 2000; Salinas et al., 2011) ve ontolojik (Petri-Hanson and Ainsworth, 2001; Watts et al., 2003; Traver et al., 2003; Peterman and Petrie-Hanson, 2006; Patel et al., 2009; Tian et al., 2009) çalışmalar bulunmaktadır. B lenfositlerin özgül bağışıklık sistemi elemanları olarak baş böbreğinde oluştukları, dalakta farklılaşarak plazma hücrelerine dönüştükten sonra gövde ve kuyruk böbreğinde de gözlenebildikleri bildirilmiştir. T lenfositlerinin gelişimi ise timusda gerçekleşmektedir (Zwollo et al., 2005; Hunt and Rice, 2008; Zwollo, 2011; Filatreau et al., 2013; Covello et al., 2013).

Özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinde görev yapan başlıca fagositik elemanlar ise yüksek omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da granülositler (özellikle nötrofiller) ve monositler ile karaciğer, böbrek ve dalak gibi dokularda yerleşen makrofajlardır.

Melanomakrofajlar, birçok balık türünde böbrek ve dalağın hematopoetik dokusunda ve karaciğerde yerleşen pigment içerikleriyle karakterize edilen fagositik hücrelerdir. Heterojen inkluzyonlar olan pigmentler melanin, hemosiderin veya lipofuskin yapısında olabilir (Press and Evensen, 1999; Agius and Roberts, 2003). Melanomakrofajlar hücre artıkları, melanin pigmentleri, hemosiderin granülleri ve lipofuskin kalıntıları gibi heterojen maddeleri aktif olarak fagosite ederler. Eritrosit yıkımıyla ortaya çıkar demiri depolarlar. Bunlara yağ, protein ve glikozaminoglikanların absorbsiyonu da eklendiğinde, oldukça büyük boyutlara ulaşabilen bu hücreler bulundukları dokuda tek tek izlenebildikleri gibi kümeleşip yığılarak melanomakrofaj merkezleri de (MM) oluşturabilirler. Hem melanomakrofajların, hem de MM'lerin sayıları ve kapladıkları alanlar çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullara göre değişebilir (Agius and Roberts, 2003).

Bu genel bilgilerden de görüldüğü üzere, teleostlarda bağışıklık sistemine ilişkin oldukça detaylı araştırmalar varsa da, baş böbreğinin hematopoetik işlevlerinin doğal uzantısı olan yaşamsal immün işlevleri hakkındaki bilgiler yetersizdir. Ayrıca, deterjan ve/veya sürfaktanların baş böbreğindeki immün tepkimeler üzerindeki olası etkilerine ilişkin herhangi bir rapora rastlanmamıştır. Benzer durum, söz konusu organın aşağıda belirtilecek olan endokrin işlevleri için de geçerlidir.

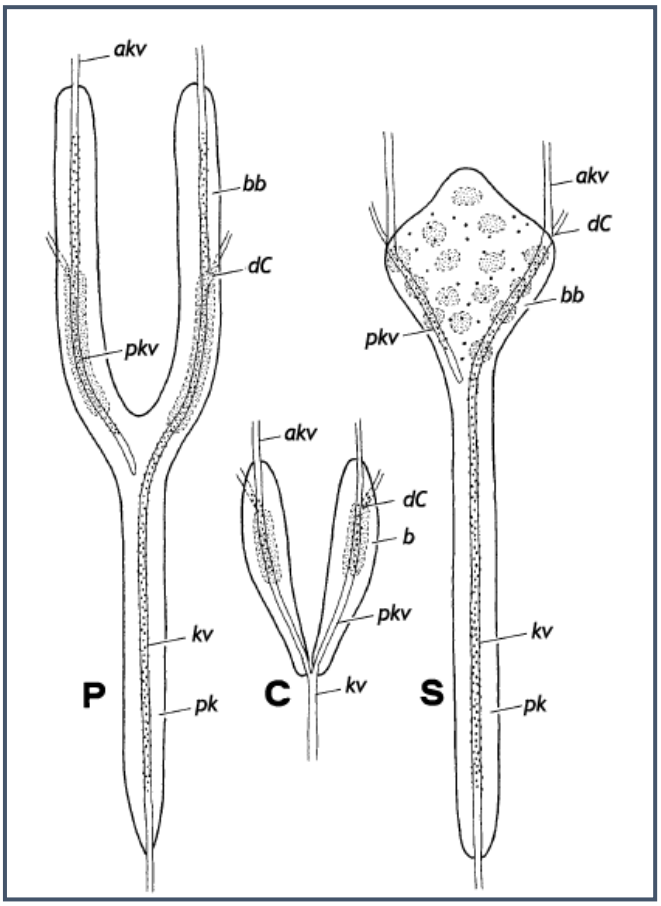
1.4.3.3 Endokrin İşlevler: İnterrenal ve kromaffin hücreler

Teleostlarda yüksek omurgalıların adrenal korteksine homolog olan interrenal ve adrenal medullaya homolog olan kromaffin hücreler üzerinde morfolojik, biyokimyasal ve deneysel araştırmalar yaklaşık yüz yıldır sürdürülmekte, son elli yılda da bu yapıların ozmotik adaptasyondaki rolleriyle çeşitli stres süreçlerindeki değişimleri büyük ilgi toplamaktadır. Bu çalışmaların

büyük çoğunluğu yakın dönemde Gallo and Civinini (2003) tarafından geniş kapsamda derlenmiştir. Mezoderm kökenli interrenal dokudan salgılanan başlıca kortikosteroid, glukokortikoid yapısındaki kortizoldür ve enerji metabolizması ile elektrolit dengesinin kontrolünde görev yapar. Kromaffin hücreler ise nöral krista kökenlidir ve stres hormonları olarak bilinen katekolaminlerin, adrenalin ve noradrenalinin sentezinden sorumludur (Hsu et al., 2003; Gallo and Civinini; 2003, 2005).

Gruplaşarak kordonlar oluşturabilen interrenal hücreler "doku" olarak tanımlandıklarında çok genel hatlarla anteriör ve posteriörde konumlanırlar. Omurgalıların adrenal bezine homolog olan kısım anteriörde, baş böbreğinde yer alır. Posteriör kısım ise gövde ya da kuyruk böbreği içerisinde gömülüdür; ozmoregülasyonda ve kardiyovasküler işlevlerde etkili olan steroidleri sentezleyen hücrelerden oluşur ve Stannius Korpüskülleri olarak adlandırılır. Ancak farklı teleost türlerinde böbrek yapısında izlenen büyük çeşitlilik, interrenal ve kromaffin hücrelerin yerleşiminde de gözlenir. Bu yerleşim çeşitliliği incelenenen toplam 55 teleost familyasına ait 129 türden elde edilen veriler kullanılarak birbirlerine ve etkileşimde oldukları damarlara göre sınıflandırılmıştır. Ancak bu çok geniş omurgalı sınıfında bazen aynı türün farklı bireylerinde bile yaşa, cinsel olgunlaşmaya ve diğer faktörlere bağlı olarak yerleşim farklılıkları gözlenebilir. Bu konuda genel kabul gören bir model (Şekil 1.4) farklı ordolara ait türlerin ele alındığı çalışmayla Grassi Milano et al. (1997) tarafından ortaya konmuştur.

Baş böbreğinde her iki hücre grubu da genellikle posteriör kardinal vena ve dallarıyla ve Cuiver kanalı çevresinde yerleşim gösterir, bazı türlerde anteriör kardinal vena ve kaudal vena çevresinde yer alabilirler (Gallo and Civinini, 2003).



Şekil 1.4 Üç farklı ordo üyesini temsil eden türlerin böbreğinde interrenal doku ve kromaffin hücrelerin yerleşimi. Kromaffin hücreler büyük noktalarla, steroid salgılayan hücreler ise küçük noktalarla gösterilmiştir. P: Perciformes (*Dicentrarchus labrax*); C: Cyprinodontiformes (*Gambusia affinis*); ve S: Salmoniformes (*Oncorhynchus mykiss*). Akv, anterior kardinal vena; dC: Cuvier kanalı; kv: kaudal vena; b: böbrek; bb: baş böbreği; pkv: posterior kardinal vena; pk: posterior böbrek (Milano and Chimenti, 1999; Gallo and Civinini, 2003'den alınmıştır).

Bu endokrin yapılaşmaların tuzluluk, su sıcaklığı gibi çevresel koşulların değişimine karşı tepkileri *P. reticulata* da dahil bazı türlerde değerlendirilmiştir Mezhnin, 1978, Chen et al, 2002; Gallo and Civinini, 2003) Ancak toksik maddelere karşı tepkileri hakkındaki çalışmalar sadece bazı metallerle sınırlıdır (Gallo and Civinini, 2003). Omurgalılarda adrenal bezin görevleri düşünüldüğünde, farklı kimyasal maddelerin söz konusu yapılaşmalar üzerindeki etkilerinin daha detaylı biçimde bilinmesine gereksinim vardır.

1.5 Sunuş

Teleostlarda baş böbreğinin yukarıda ana hatlarıyla tanımlanan çok karmaşık yapısı ve bazıları ciddi tartışmalara konu olan çok önemli işlevleri vardır. Günlük yaşamda neredeyse hiç düşünmeden kullandığımız deterjanlar ve bu kimyasalların etkin maddesi olan sürfaktanların bu yapı üzerindeki etkilerine ilişkin herhangi bir rapora ulaşılamamıştır. Bu tez çalışması; konuyla ilgili veri tabanlarının genişletilmesine katkıda bulunması umuduyla; SLS'nin ekotoksikolojik araştırmalarda giderek daha yaygın bir model olarak kullanılan *P. reticulata* baş böbreğinde renal, hematopoetik, immün ve endokrin işlevler üzerindeki başlıca etkilerinin ışık mikroskobu gözlemleri ve bazı istatistiksel verilerle ortaya konabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOT

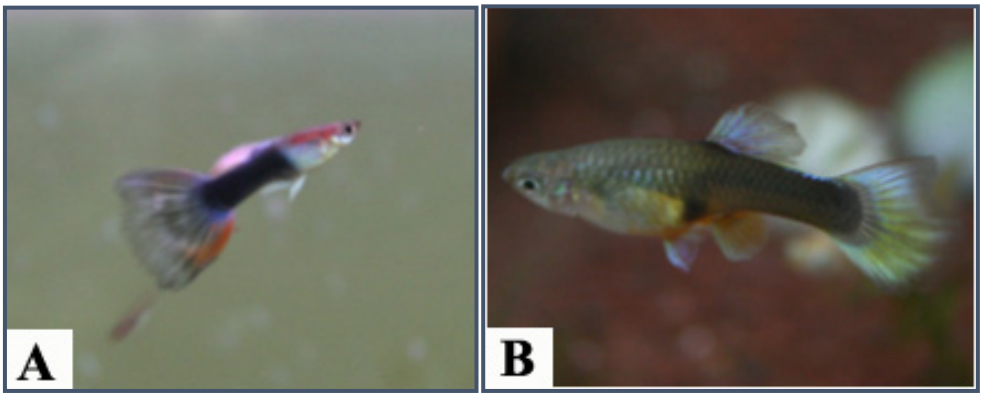
Bu araştırma Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi tarafından hazırlanan Deney Hayvanları İçin Etik Kurul Kararlarına göre ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu 2010-62 Sayılı Raporu uyarınca yürütülmüştür.

2.1 Materyal

2.1.1 Deney hayvanları

Sunulan tezde ticari akvaryumculardan temin edildikten sonra aşağıda anlatılan laboratuvar koşullarında üretilen *P. reticulata* (guppy, lepistes) örnekleri kullanılmıştır. Türün sistematik bilgisi aşağıdadır:

Phylum: Chordata
Subphylum: Vertebrata
Classis: Osteichthyes
Subclassis: Actinopterygii
Superordo: Teleostei
Ordo: Cyprinodontiformes
Subordo: Cyprinodontoidea
Familia: Poecilidae
Genus: Poecilia
: *Poecilia reticulata* (Peters, 1859)



Şekil 2.1 Erkek (A) ve dişi (B) *P. reticulata* örnekleri.

P. reticulata renkli bir akvaryum balığı olarak çok popülerdir (Şekil 2.1). Dağılım alanı Güney Amerika'nın kuzeyinden başlar ve Karayip adaları civarına kadar uzanır. Sığ nehirlerde ve küçük göletlerde, hafif tuzlu, pH derecesi 7-8 olan 18-28^{o}C sıcaklıktaki sularda yaşar, bentopelajik ve ovovivipardır (Khoo et al., 1999; Toussaint et al., 2001; Law, 2003; Hawkins et al., 2003; Wang et al., 2008; Kent et al., 2009). Kirli sularda gösterdiği direnç sayesinde bazı ülkelerde sivrisinek populasyonunun kontrolünde kullanılır (Shuhaimi-Othman et al., 2013).

Ortalama 3,5 cm boyunda, farklı renk ve desendeki *P. reticulata* erkekleriyle, ortalama boyları 5 cm olan renksiz dişiler arasında cinsiyet ayrımı kolayca yapılır. Dişiler her 4-6 haftada bir, yaklaşık 20-40 kadar yavru doğururlar.

2.1.2 SLS

Sigma Aldrich firmasından temin edilen materyalin CAS numarası 151–21–3'tür.

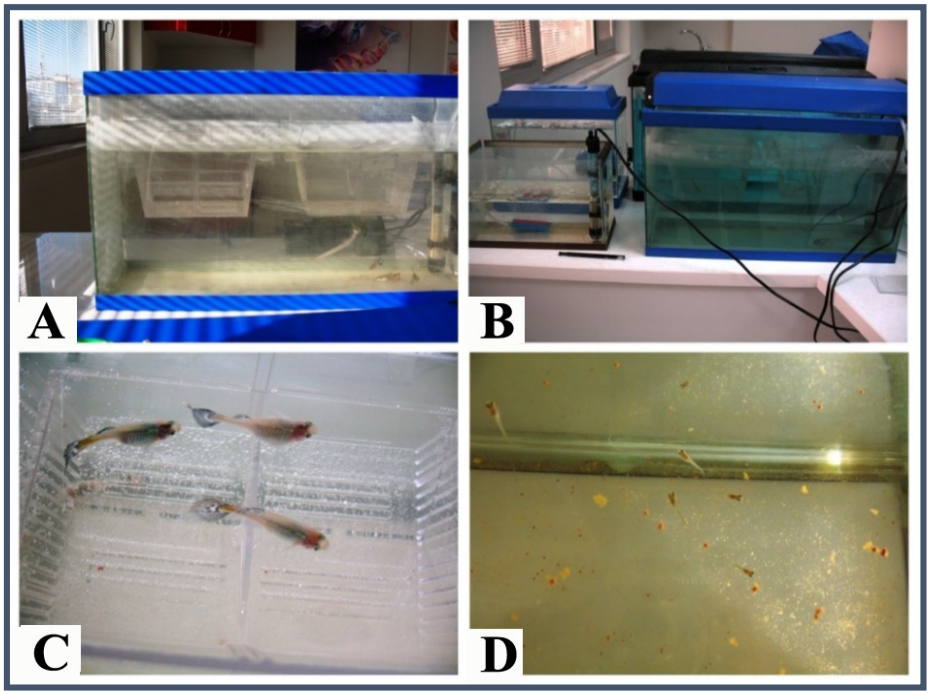
2.2 Metot

2.2.1 Ortam koşulları

Çalışmada ticari akvaryumcularda sağlanarak kısa süre içinde ortama alıştırılan örnekler yerine laboratuvar koşullarında bu amaçla üretilen bireylerin kullanılması tercih edilmiştir. Satın alınan 20 dişi, 5 erkek *P. reticulata* örneği 15 gün süre ile 30 L hacminde ve dinlendirilmiş şebeke suyu içeren akvaryuma konularak öncelikle parazit vb. yönünden sağlıklı olup olmadıkları gözlenmiş ve ortama uyum göstermeleri sağlanmıştır. Laboratuvar ortamında gerçekleşen döllenme sonrasında; hamile bireyler ticari olarak temin edilen yavruluklara, yeni doğan yavrular ise küçük akvaryumlara alınmıştır. Yavrular bir ay sonra üstten filtreleme bulunan; doğal ortama benzerlik sağlaması amacıyla çeşitli su bitkileriyle desteklenen 120 L hacmindeki akvaryuma aktarılmış (Şekil 2.2 E) ve günde iki kez, türe uygun olarak seçilen ticari balık yemi ile beslenerek erişkin hale gelmeleri beklenmiştir. Bu sürdürülebilir sistemle üç ay sonra 100'den fazla sağlıklı *P. reticulata* örneği elde edilmiştir.

Kontrol ve deneme gruplarının her biri için rastgele seçilen beş dişi, beş erkek örnek (N=80); 15 gün süreyle, 20 L hacminde ve dinlendirilmiş şebeke suyu içeren beş ayrı akvaryuma alınarak yeni ortamlarına alışmaları sağlanmıştır.

Denemeler Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde, 2011 Ağustos ayında gerçekleştirilmiştir. Bornova İlçesi şebeke suyu parametreleri; Fransız sertliği 31,0–32,0; tuzluluk % 0,1; pH 7,5–7,9; serbest klorür 0,6 mg/L; sodyum 18 mg/L; alüminyum 0,030±0.008 mg/L; demir 0,055±0,024 mg/L olarak belirlenmiştir. Doğal fotoperiyotta gerçekleştirilen deneme süresinde su sıcaklığı 25±2 ^{o}C olarak ayarlanmış ve örneklerin günde iki kez beslenmelerine devam edilmiştir.



Şekil 2.2 Laboratuvarda kurulan düzenek. A. İlk örneklerin bulunduğu akvaryum. B. Düzeneğin bulunduğu ortam. C. Yavruluklar içindeki hamile dişiler. D. Yavruların bulunduğu akvaryum. E. Ticari olarak temin edilen 120 litrelik bitkili akvaryum.

2.2.2 Uygulama

Uygulama grupları subletal konsantrasyonlar olarak seçilen 3, 6, 9 ve 12 mg/L konsantrasyonlarda olmak üzere doğrudan doğruya akvaryum suyuna eklenen SLS'ye, statik test koşullarında ve 96 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Hiçbir kimyasal uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu örnekleri uygulama grubundaki örnekler ile aynı sıcaklık ve fotoperiyotta tutulmuştur. Bütün örneklerin günde iki kez beslenmesi sürdürülmüştür.

2.2.3 Histolojik incelemeler

Uygulama süresi bitiminde kontrol ve her bir deneme grubunda iki dişi, iki erkek gözle ayrıldıktan sonra cinsiyeti önemsenmeden alınan birer örnek, farklı hematopoezis serilerindeki hücrelerin incelenebilmesi için MS222 (Sigma-Aldrich) ile uyuşturulduktan sonra disekte edilmiştir. Baş böbreğinin hematopoetik dokusundan sağlanan yayma preparatlar % 100' lük metanolde 10 dk fikse edildikten sonra Wright-Giemsa ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) yöntemleriyle boyanmıştır.

Kontrol ve her bir deneme grubunda kalan iki dişi, iki erkek örnek de yine MS222 (Sigma-Aldrich) ile uyuşturulup fiksatiflerin dokulara daha iyi nüfuz edebilmesi için anal bölgeden solungaçlara kadar açılmıştır. Bouin çözeltisinde 24 saat tutulan örnekler %70 alkole alınarak sarı renk giderilinceye kadar alkol sürekli değiştirilmiştir. Yine 24 saat süreyle %10 nötral formalinde fiske edilenler ise bir gece akarsuda bekletildikten sonra %70 alkole alınmıştır. Bütün örnekler şeffaflaştırma işlemlerinden sonra total olarak parafine gömülüp Leica RM 2145 marka mikrotomla 5µm kalınlığında seri kesitler alınmış ve genel yapıyı belirleyebilmek için Mayer ve Gill Hematoksilen&Eosin (H&E) boyama yöntemleri kullanılmıştır. Histopatolojik incelemelerin tamamı erkek örneklerden elde edilen preparatlardan yapılmıştır.

Farklı bölgelerdeki hücrelerde glikojen granüllerini inceleyebilmek amacıyla PAS; protein içeriklerindeki değişimleri saptamak için de Paraldehit Fuksin (PAF) boyama yöntemleri uygulanmıştır. İnterrenal-kromaffin dokuda ayrım ve değişimlerin belirlenmesinde Masson Trikrom (MaT) ve Mallory Trikrom (MT) yöntemleri tercih edilmiştir. Melanomakrofajlarda farklı pigment içeriklerini gözleyebilmek amacıyla seçilen kesitler ise Prussian Blue ve Turnbull Blue yöntemleriyle boyanmıştır.

Tüm kesitlerde Carl-Zeiss Primostar marka ışık mikroskobundan yapılan incelemeler AxioCam ERc5s kamera ile fotoğraflanmıştır.

Hematopoetik dokuda gelişim aşamalarının belirlenmesinde Fijan (2002a) ve Kondera (2011) tarafından rapor edilen bilgiler esas alınmıştır. Histopatolojik değişimler ise Bernet et al. (1999) tarafından verilen ve bu tür çalışmalarda standardizasyonu hedefleyen Çizelgeler öncelikle dikkate alınarak değerlendirilmiştir.

2.2.4 İstatistiksel Değerlendirmeler

Baş böbreğinin tartışmalı renal ve endokrin işlevleri uzantısında glomerulus çapları, bowman alanları ile interrenal ve kromaffin hücre ve nukleus çapları ölçülerek elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle değerlendirilmiştir.

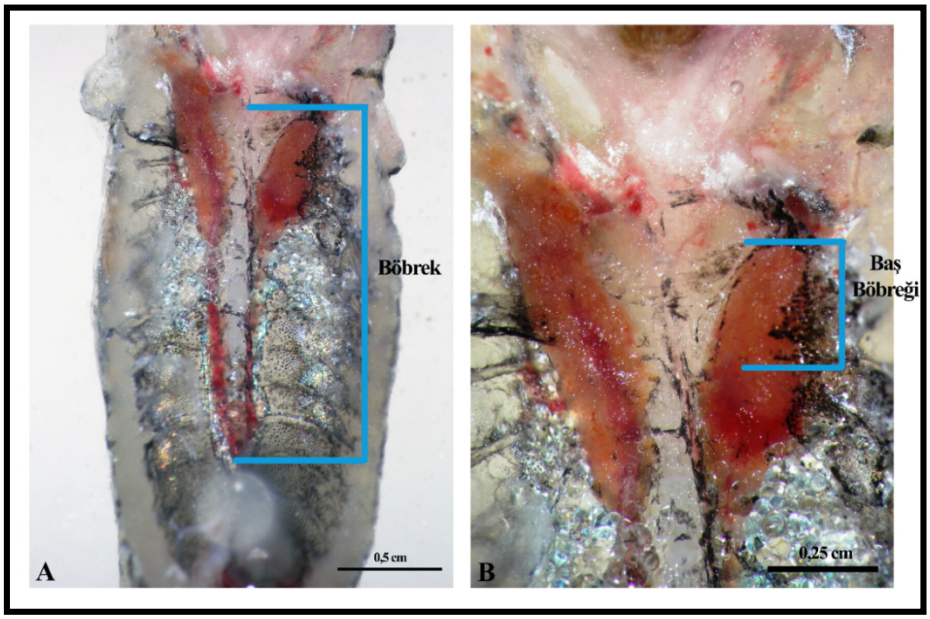
Glomerulus çap ölçümleri her bir grup için ayrı ayrı 10 preparatta Carl-Zeiss AxioCam ERc5s görüntüleme ve analiz sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seri preparatlardan sadece baş, orta ve sonda yer alanlar kullanılmış; tek glomerulus gözlenen preparatlar ölçüm dışında bırakılmıştır. Her bir glomerulus için pariyetal tabaka dahil en büyük ve en küçük çaplar ölçülerek bulunan ortalama değer kaydedilmiştir. Bowman boşluğu ölçümlerinde ise dört farklı ölçümün ortalama değeri kaydedilmiştir. İnterrenal ve kromaffin hücreler ile nukleuslarında da en büyük ve en küçük çaplar ölçülüp ortalama alınmıştır.

Öncelikle tek yönlü Anova Varyans Analizi ile değerlendirilen verilerin homojenite analizlerinde Levene Testi, dağılım analizlerinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk Testleri; farklılıkların belirlenebilmesi için de Kruskal Wallis Testi kullanılmış, sonuçlar çizelge halinde sunulmuştur.

3. BULGULAR

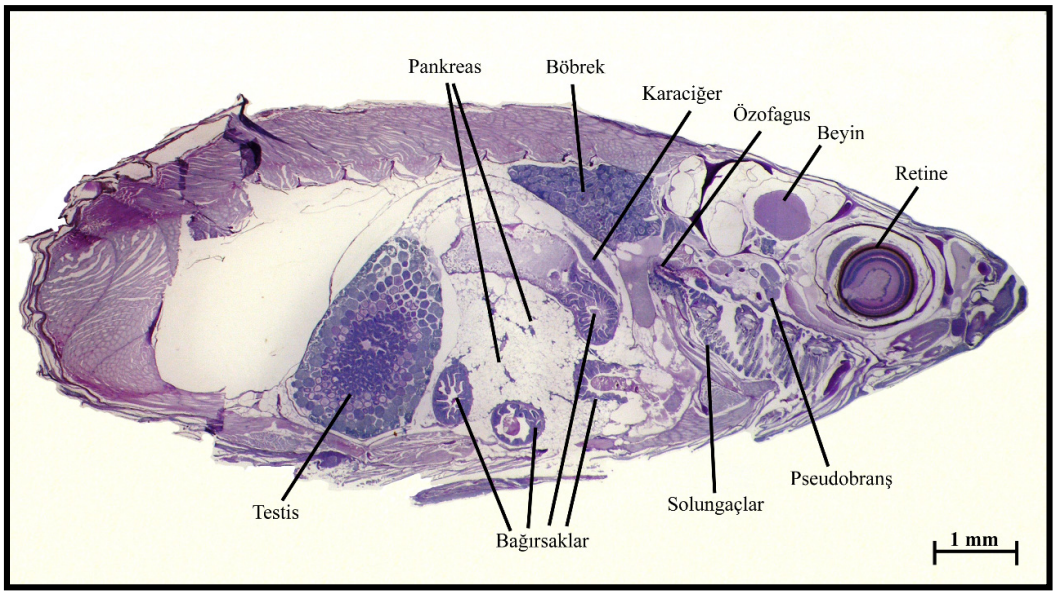
3.1 Kontrol Grubunda Baş Böbreği: Genel Yapı

Özofagusun dorsal ve lateral bölgesinde yerleşen "V" şeklindeki böbrek anteriörde solungaçların hemen bitiş bölgesine; posteriörde ise anal açıklığın biraz gerisine kadar uzanmaktadır (Şekil 3.1A). Sol böbrek sağ böbreğe oranla daha büyüktür. Anteriöre uzanan kısımda doku yoğun bir yapılaşma göstermektedir.



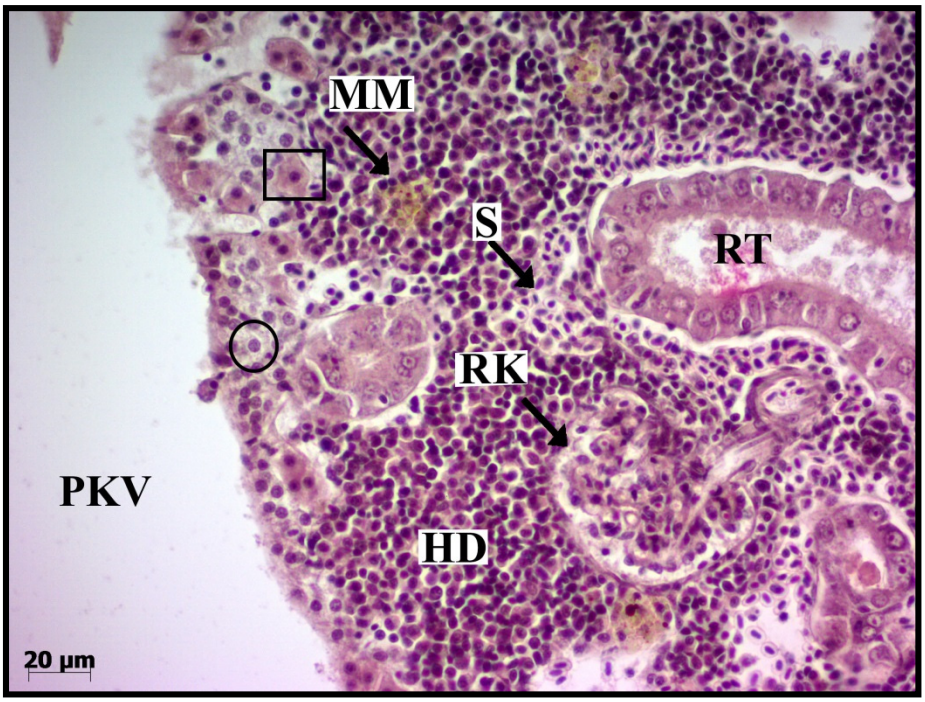
Şekil 3.1 *P. reticulata*'da böbrek (A) ve baş böbreği (B).

Total kesitlerde böbrek anterodorsalde büyük ve tipik "V" şekliyle kafatasının hemen ardında kompakt halde izlenmekte, baş böbreği ayırt edilememektedir (Şekil 3.2). Histolojik incelemelerde baş böbreği gövde böbreğinden renal korpüskül, toplayıcı tübül ve kanalların çok daha az gözlenmesiyle ayrılmıştır (Şekil 3.3, 3.4). Buna göre anatomik olarak tüm böbreğin yaklaşık 1/3'ünü oluşturmaktadır (Şekil 3.1B)

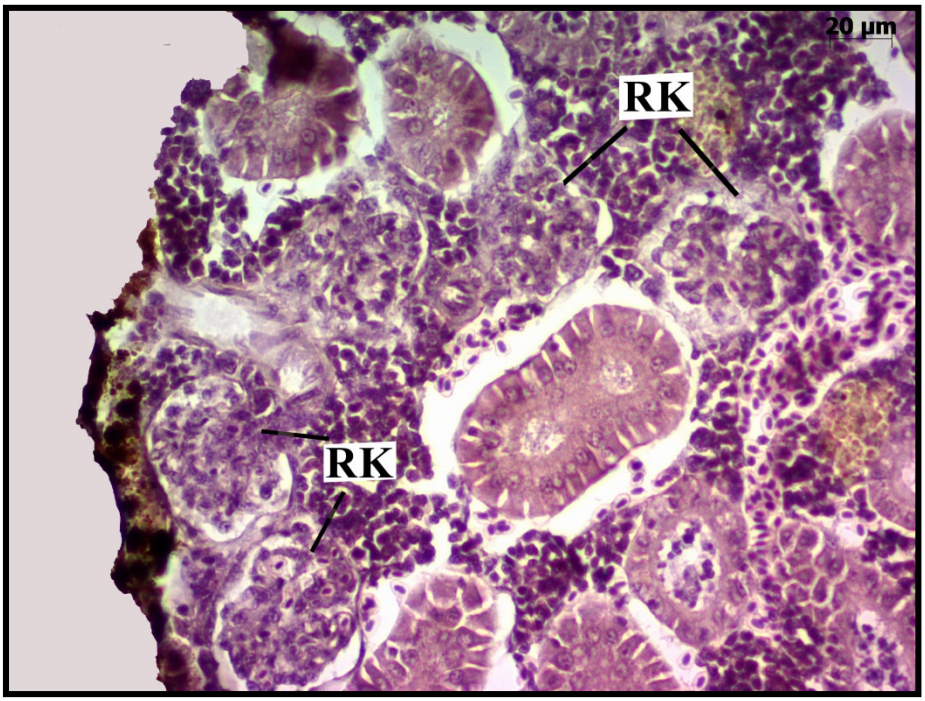


Şekil 3.2 Erkek *P. reticulata* örneğinden hazırlanan total kesitte böbreğin diğer organlara göre konumu. PAS.

Kranyuma en yakın bölgelerden alınan kesitlerde (Şekil 3.3) baş böbreğinin renal korpüskül ve tübülleriyle toplayıcı kanallar, zorlukla gözlenebilen retiküler liflerin desteklediği hematopoetik dokuyla çevrelenmekte, aralarda yer yer genişleyen sinüzoidler izlenmekte ve koyu sarı-kahverengi boyanan melanomakrofaj merkezleri kolayca görülebilmektedir. Özellikle post kardinal vena çevresinde koyu renkli, çok kenarlı interenal hücreler ile açık renkli kromaffin hücreler ayırt edilebilmektedir.



Şekil 3.3 Baş böbreğinin genel histolojik yapısı. Renal korpüskül (RK), tübüller (RT) ve toplayıcı kanallarla sinüzoidleri (S) çevreleyen hematopoetik dokuda (HD) melanomakrofaj merkezleri (MM) ile posterior kardinal vena (PKV) çevresindeki interrenal (çember içerisinde) ve kromaffin hücreler (dikdörtgen içerisinde). H&E.

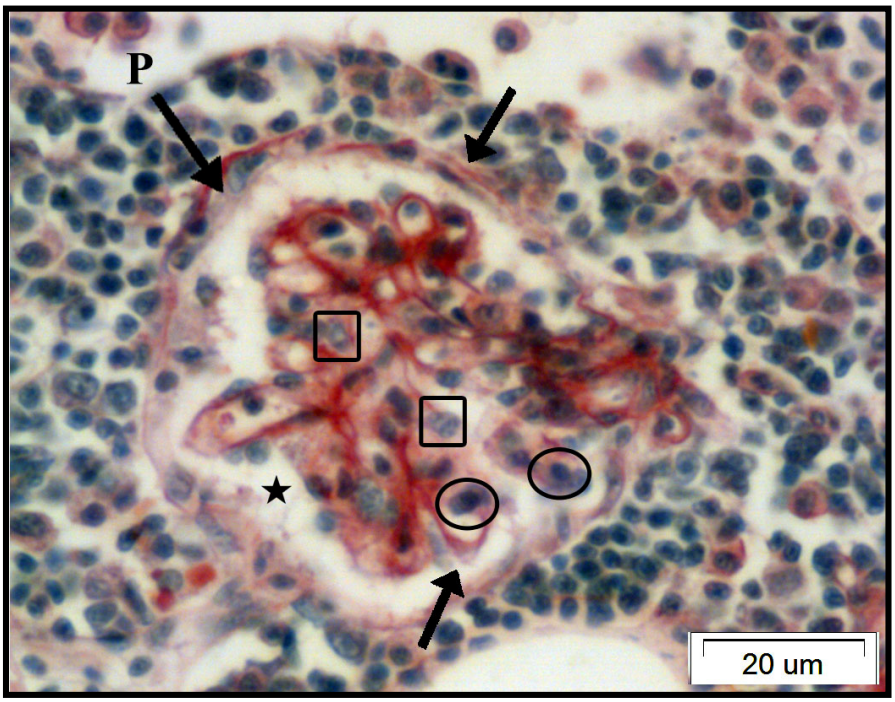


Şekil 3.4 *P. reticulata*'da gövde böbreğinde daha sık izlenen renal korpüsküller (oklar). H&E.

Baş böbreğinin renal, hematopoetik, immün ve endokrin elemanları ayrıca değerlendirilmiştir.

3.2 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Renal Elemanları

Renal korpüsküllerde kılcal damar yumağından oluşan glomerulus, Bowman kapsülünün pariyetal ve visseral tabakalarıyla çevrilidir. İki tabaka arasında Bowman alanları bulunur. Dıştaki pariyetal tabaka tek sıra yassı epitel hücrelerinden, içteki visseral tabaka ise uzantılı podositlerden ibarettir. Koyu renkli, nukleusları belirgin podositler arasında daha açık boyanan, poligonal ve büyük mezangiyal hücreler granüler görünümlüdür (Şekil 3.5).

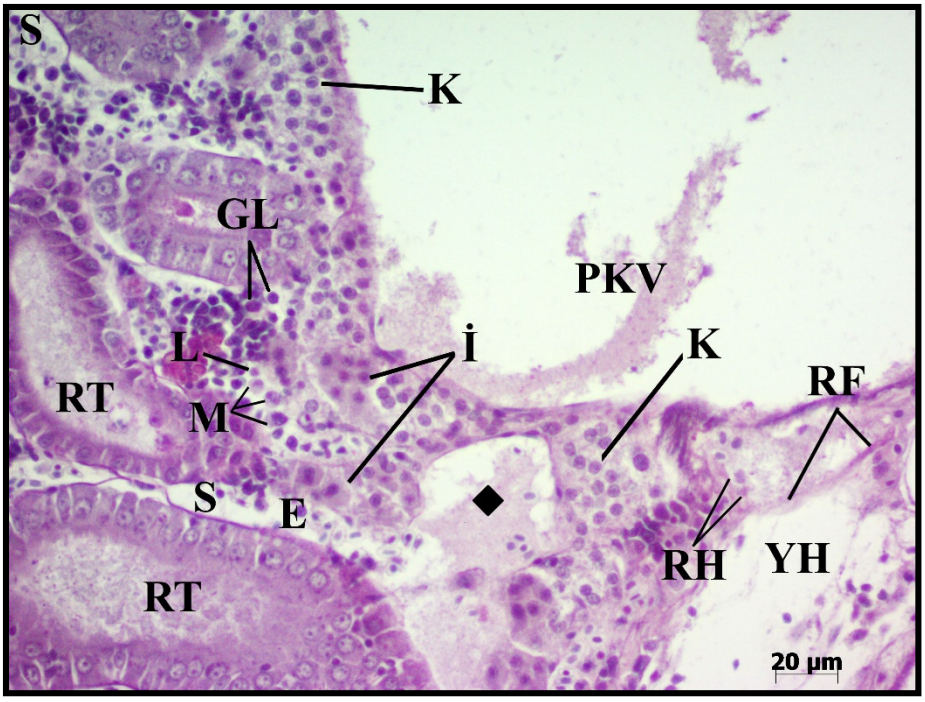


Şekil 3.5 Kontrol grubunda renal korpüskül. Bowman kapsülünün dıştan retiküler fibrillerle desteklenen (ok) pariyetal tabakası (P) altında Bowman alanı (yıldız); podositlerden (daire içerisinde) oluşan visseral tabakada mezangiyal hücreler (dikdörtgen içerisinde). PAS.

Böbrek tübülleri genellikle kübik ve bazen tipik fırçamsı kenar yapısının yer yer izlenebildiği silindirik epitelden oluşur ve kapillerlerle çevrelenirler (Şekil 3.3). Kanal ve tübüllerin lümenleri farklı yoğunlukta materyalle dolu ve yer yer vakuoler görünümlüdür.

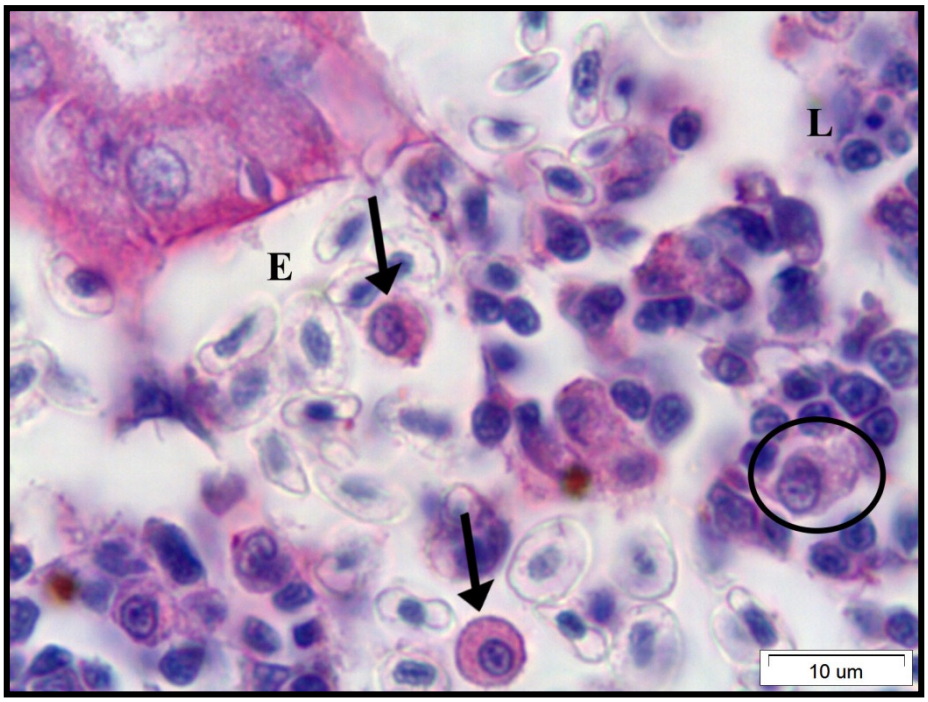
3.3 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Hematopoetik Elemanları

Post kardinal vena çevresinde retiküler hücre ve fibrillerle desteklenen hematopoetik doku hipersellülerdir, yağ hücreleri nadiren görülebilmektedir; sinüzoidler çok geniş değildir; eritrosit ve monositler kolayca ayırt edilirken granüllü lökositler ile lenfositlerin seçilmesi zordur (Şekil 3.6). Hematopoetik elemanlar arasında renal tübüller ile endokrin elemanlar yerleşmiştir.



Şekil 3.6 Baş böbreğinde genel yapı. Post kardinal vena (PKV) ve kollarını (♦) çevreleyen hematopoetik dokuda; S: sinüzoidler, E: eritrositler, GL: granüllü lökositler, M: monositler, L: limfosit, RH: retiküler hücreler, RF: retiküler fibriller, YH: yağ hücreleri, ayrıca interrenal (İ) ve kromaffin hücreler (K) ile renal tübüller (RT) PAS.

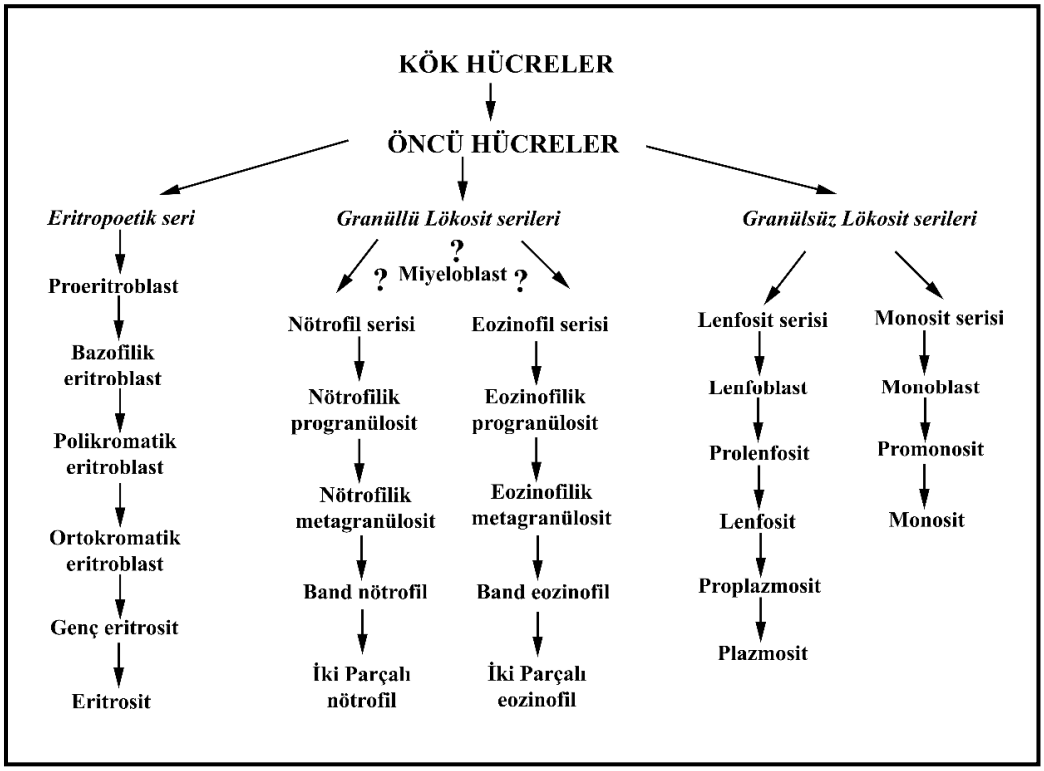
Kesitlerde hücre ayrımı ancak genel anlamda yapılabilmektedir (Şekil 3.7).



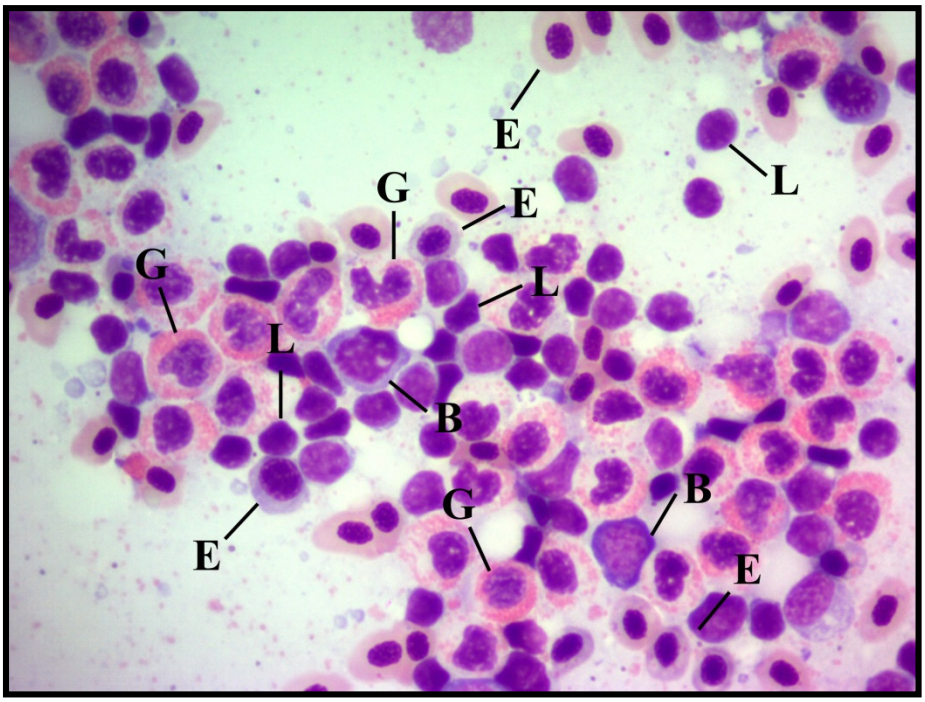
Şekil 3.7 Kontrol grubunda eritrositler (E), lenfositler (L), granüllü lökositler (oklar) ve bir öncül hücre (daire içerisinde). PAS.

Bu genel ayrımın yeterli olmaması nedeniyle, hematopoezis aşamaları baş böbreğinden hazırlanan yayma preparatlarda detaylarıyla incelenmiş, ancak bazı kuşkular nedeniyle bazofil serisindeki hücrelere ilişkin gözlemlere yer verilmemiştir. Kullanılan yöntemlerle kök hücre-öncü hücre ayrımı yapılamamış, izlenebilen farklı hematopoetik serilerde aşamalar Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 3.1 Kontrol grubunda izlenebilen hematopoetik serilerde farklı hücrelerin gelişim aşamaları.



Yayma preparatlarda büyük, düzensiz şekilli, gri-mavi renkte boyanan sitoplazmalarında geniş yer kaplayan ve mor tonlarda boyanan nukleusları ile blastlar hemen seçilebilmektedir. Farklı aşamalardaki eritropetik hücreler yuvarlak-oval şekillidir, nukleusları koyu mor boyanmaktadır. Granülopoetik seriler kırmızı tonlarda boyanan hetereojen sitoplazmalarda düzensiz şekilli, bazen parçalı görülen, diğer hücrelere göre daha açık tonlarda boyanan nukleuslarıyla belirgindir. Koyu renkli lenfopoetik seri hücreleri küçük, oval, bazen düzensiz şekillidir, nukleusları zorlukla görülebilmektedir (Şekil 3.8).

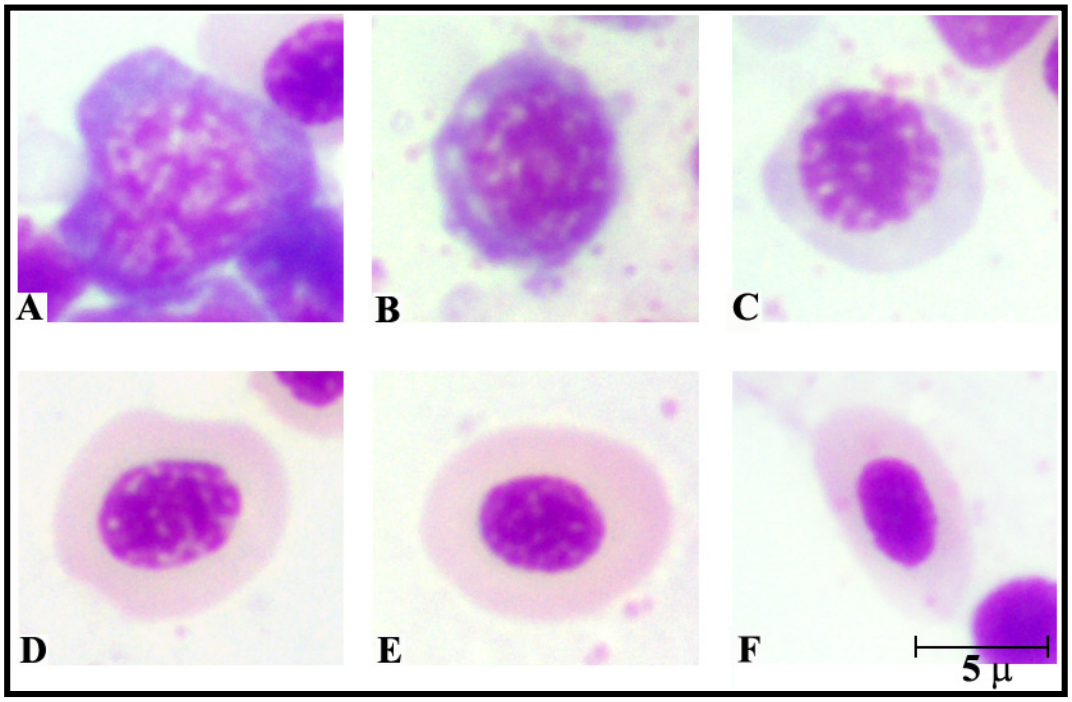


Şekil 3.8 Kontrol grubu baş böbreği, hematopoetik dokudan yayma preparasyon. Blast hücreler (B) ile eritropoetik (E), granülopoetik (G), lenfopoetik (L) hücreler. Wright&Giemsa.

3.3.1 Eritrositlerin Gelişimi

Eritropetik serinin (Çizelge 3.1) başlangıcını oluşturan proeritroblastlar düzensiz şekilli, büyük hücrelerdir. Mavi-mor renkteki heterojen sitoplazmalarında kırmızı tonlarda boyanan, granüler görünümlü kromatinik yapısıyla nukleus çok geniş yer kaplamaktadır (Şekil 3.9A). Bazofilik eritroblastlar proeritroblastlara göre küçüktür, hücre sınırları düzenli değildir, merkezde konumlanmayan nukleusda kromatin materyal daha yoğun görülmektedir (Şekil 3.9B). Bazofilik eritroblastlardan daha küçük ve sınırları yine düzensiz olan polikromatik eritroblastlarda sitoplazma rengi açılarak homojen gri-maviye döner; daha yoğun granüler görünümlü kromatinle dolu ve yine merkezi yerleşim göstermeyen nukleus hücrenin yaklaşık yarısını kaplar (Şekil 3.9C). Ortokromatik eritroblastlar bir önceki aşamaya göre büyüktür, sınırları hala düzensiz, sitoplazmaları koyu pembe ve homojen görülmektedir, nukleus merkezdedir ve yoğun görünümlüdür (Şekil 3.9D). Bu hücrelerden biraz daha büyük olan genç eritrositler düzgün ovaldir, daha koyu pembe tonunda boyanmış sitoplazmalarında yine oval şekilli ve menekşe renkli nukleuslar daha homojen görünmektedir (Şekil 3.9E). Olgun eritrositler genç eritrositlerden daha

küçük, tipik elipsoid hücrelerdir; nukleusları homojen boyanmaktadır (Şekil 3.9F).



Şekil 3.9 Kontrol grubunda eritropoesiz aşamaları. A: Proeritroblast, B: Bazofilik eritroblast, C: Polikromatik eritroblast, D: Ortokromatik eritroblast, E: Genç eritrosit, F: Eritrosit. Wright&Giemsa.

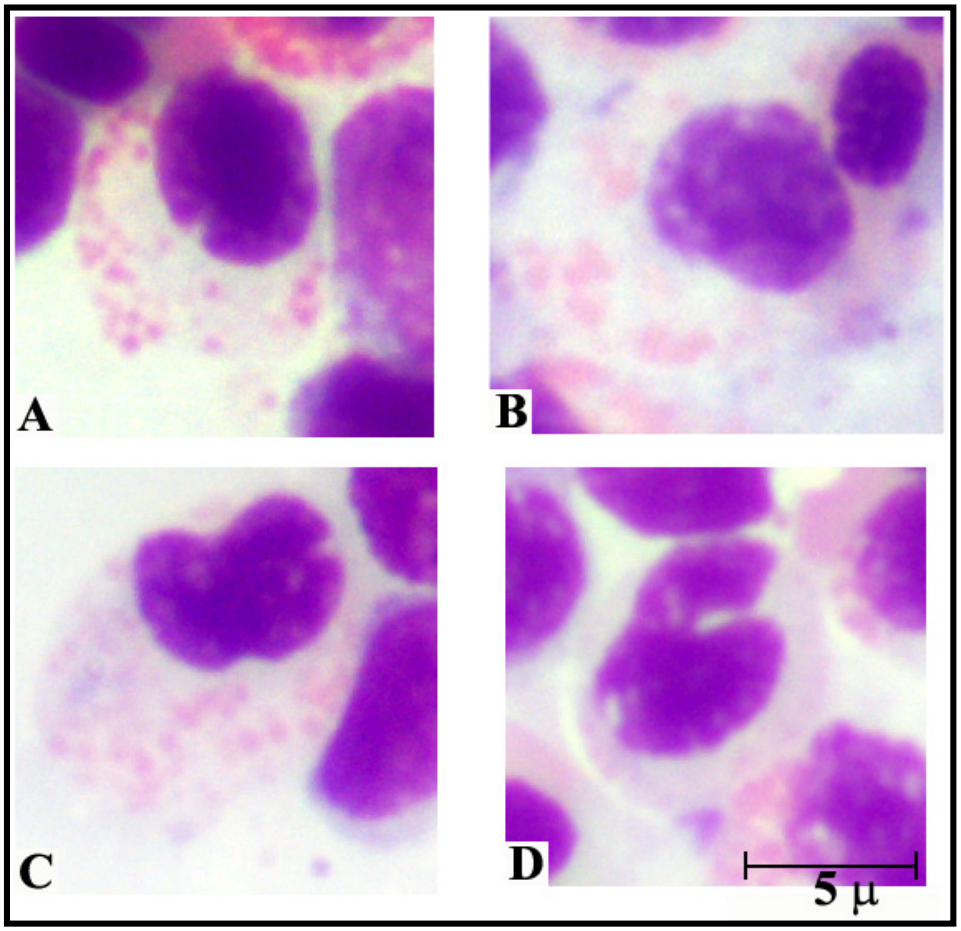
Bu gözlemlere göre eritropoezisin karakteristikleri dereceli olarak bazofilikten eozinofiliğe dönen sitoplazma rengi; düzensizken sırayla yuvarlak, oval ve elipsoide dönen hücre şekli, polikromatik eritroblast aşamasına doğru dereceli olarak azalıp sonra tekrar artan hücre büyüklüğü ve gelişim başlangıcından sonuca doğru giderek azalan nukleositoplazmik orandır.

3.3.2 Granüllü lökositlerin gelişimi

Yukarıda da vurgulandığı üzere bazofilik seriye ilişkin gözlemler kuşkulu bulunduğundan sadece nötrofil ve eozinofil olmak üzere iki seri tanımlanabilmiş, bu serilerin ilk aşamasını oluşturan miyeloblastlar ayırt edilememiştir.

Nötrofil Serisi: Serinin miyeloblastlardan sonraki aşamasını oluşturan (Çizelge 3.1) nötrofilik progranülositler büyük hücrelerdir, içerisinde pembemsi

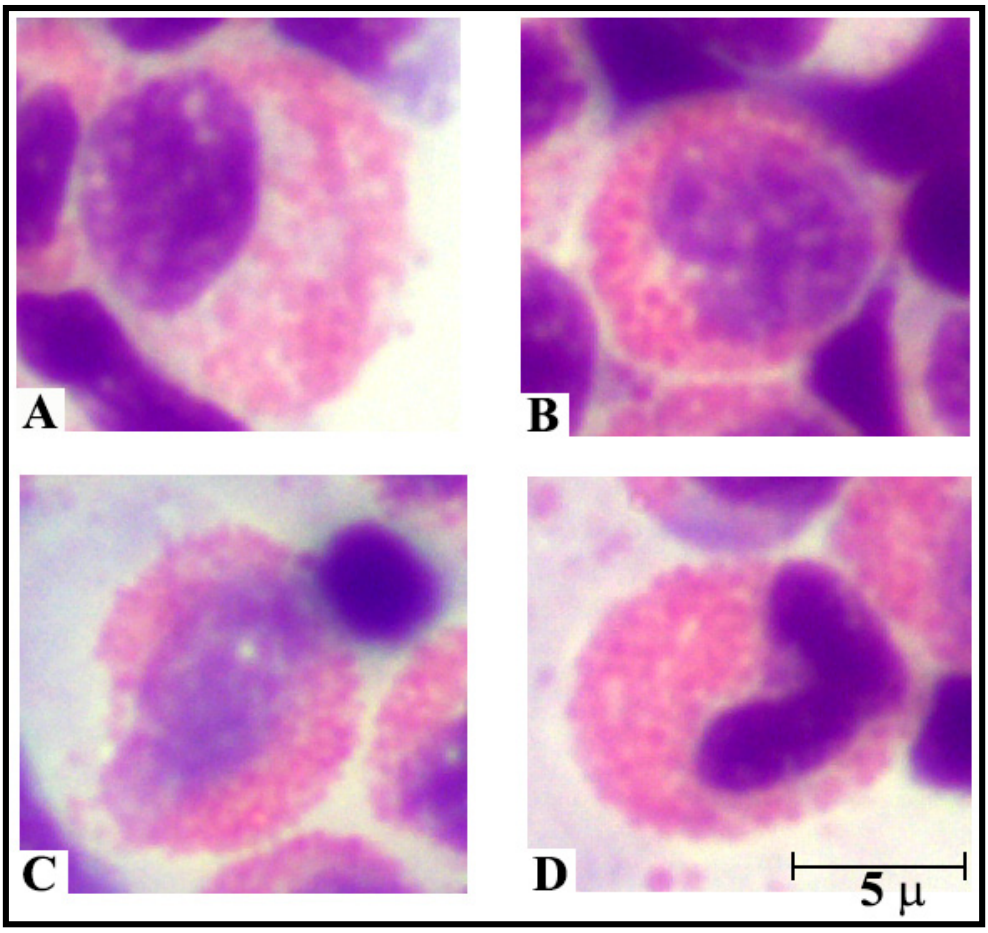
boyanan granüllerin izlendiği sitoplazma gri-mavi boyanmakta, çok koyu mor renkteki iri nukleus merkezi yerleşim göstermemektedir (Şekil 3.10A). Nötrofilik metagranülositlerde (Şekil 3.10B) sitoplazmanın boyanma özellikleri değişmezken granüller nisbeten azalır, nukleus küçülmeye ve rengi açılmaya başlar. Bant nötrofillerde granüller halen görülebilmektedir, nukleus çöküntülü ve çentikli haldedir (Şekil 3.10C). Son aşamada granüller izlenemez, nukleus parçalı görünümdedir (Şekil 3.10D).



Şekil 3.10 Kontrol grubunda nötropoezis aşamaları. A: Nötrofilik progranülosit, B: Nötrofilik metagranülosit, C: Band nötrofil, D: İki parçalı nötrofil. Wright&Giemsa.

Eozinofil Serisi: Nötrofil serisine göre daha sık gözlenmiştir. Progranülositlerin (Çizelge 3.1) çok açık gri tonda boyanan sitoplazmalarında bol miktarda, tipik eozinofilik granüller periferde daha yoğundur (Şekil 3.11A) nukleus nerkezi yerleşimli değildir. Metagranülositlerde (Şekil 3.11B) sitoplazmanın neredeyse tamamı çok belirgin eozinofilik granüllerle doludur, yine

merkezde konumlanmayan nukleus çentikli görülebilir. Band eozinofillerde (Şekil 3.11C) belirgin biçimde uzamış olan nukleus, içleri granül dolu olan parçalı eozinofillerde (Şekil 3.11D) tipik loplu görünümdedir. Olgun eozinofiller nötrofillerden daha büyüktür.

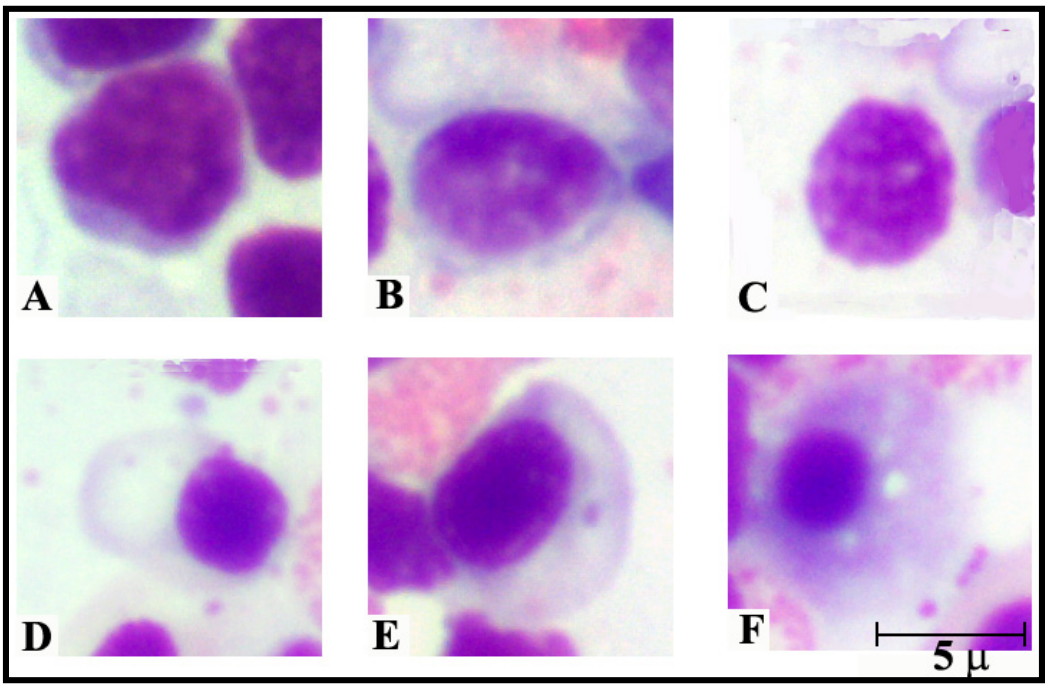


Şekil 3.11 Kontrol grubunda granülopoezis aşamaları. A: Eozinofilik progranülosit, B: Eozinofilik meta granülosit, C: Band eozinofil, D: Parçalı eozinofil. Wright&Giemsa.

3.3.3 Granülsüz Lökositlerin Gelişimi

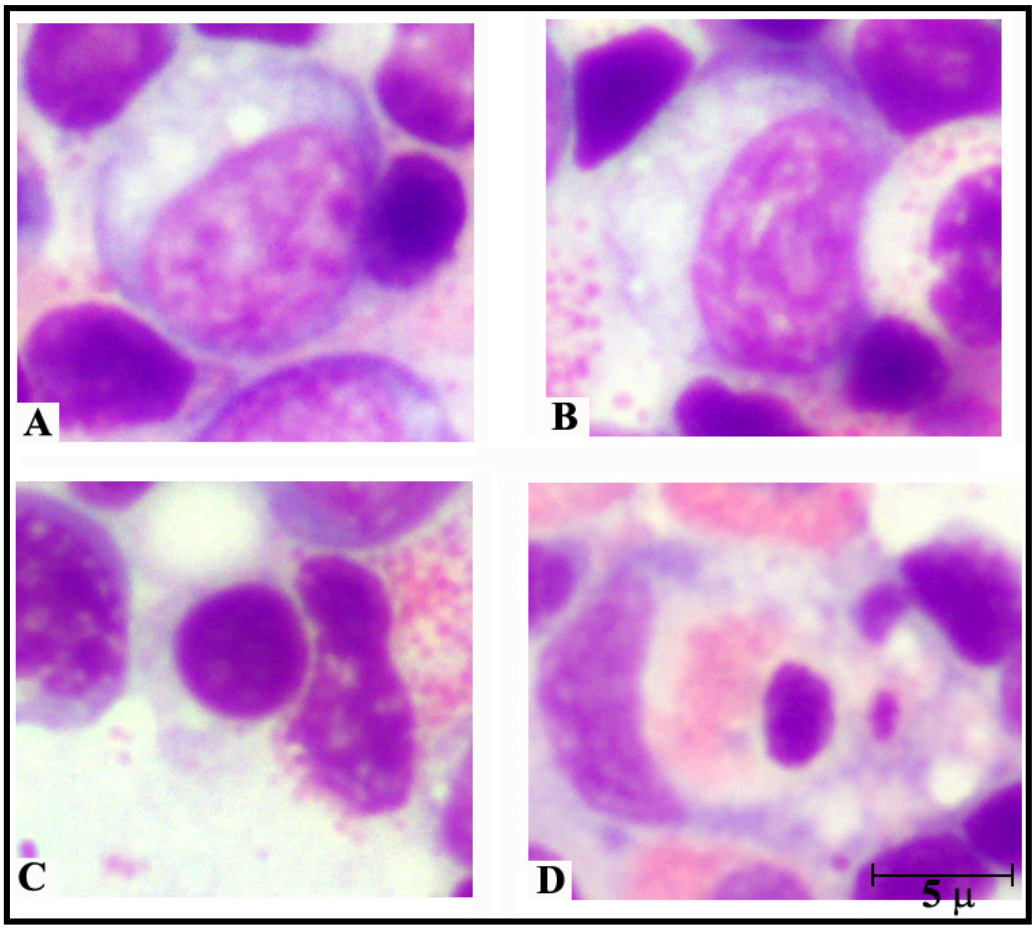
Lenfosit serisi: Serinin lenfoblastları (Şekil 3.12A), koyu mor renkte boyanan şekilsiz nukleusları sitoplazmayı neredeyse tamamen kaplamış olan küçük hücrelerdir. Prolenfoid hücrelerde rengi çok az açılan nukleus oval-yuvarlak şekilli ve merkezi konumludur; mavimsi boyanan, homojen görünümlü sitoplazmada yine çok büyük yer tutmaktadır (Şekil 3.12B). Lenfositlerde sitoplazmanın boyanma özelliği değişmemekte, ancak oldukça küçülen nukleusun rengi açılmayı sürdürmektedir (Şekil 3.12C). Proplazmosit (Şekil 3.12D) ve

plazmositlerin (Şekil 3.12E, F) tipik özellikleri nukleusun giderek çok belirgin biçimde küçülmesidir, sitoplazmada bazen vakuoller izlenmesi dışında herhangi bir değişim yoktur.



Şekil 3.12 Kontrol grubunda lenfopoezis aşamaları. A: Lenfoblast, B: Prolenfosit, C: Lenfosit, D: Proplazmosit, E ve F: Plazmosit. Wright&Giemsa.

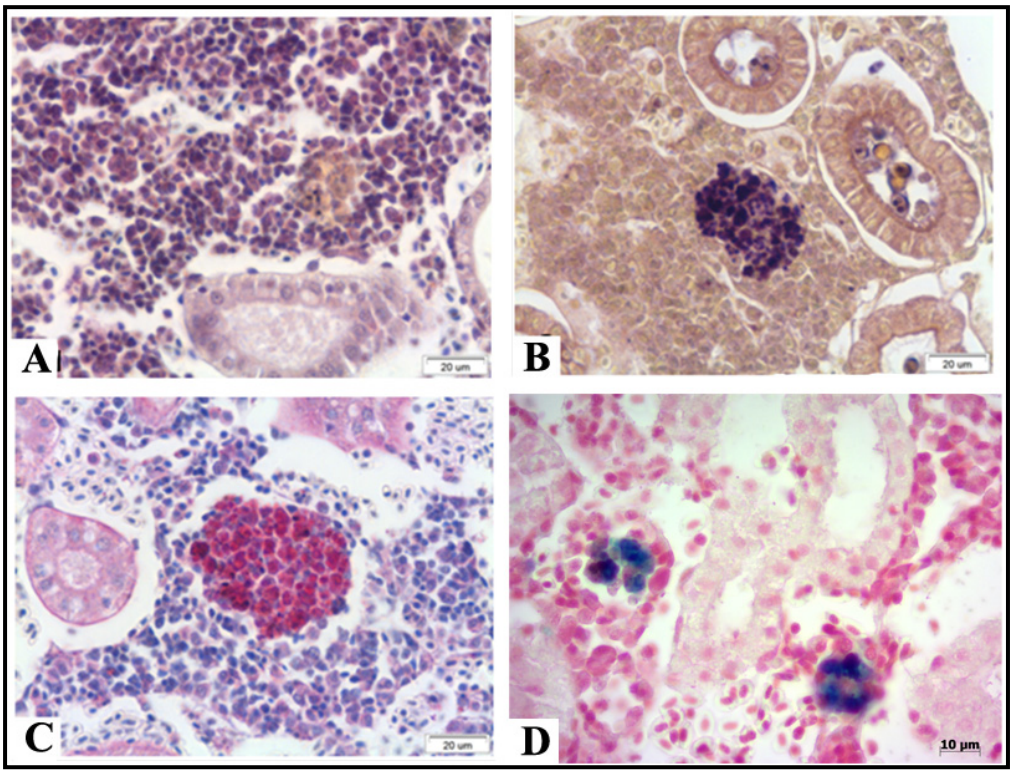
Monosit serisi: Hematopoetik dokudaki en büyük hücreler olan monoblastların (Şekil 3.13A). açık mavi tonlarda boyanan heterojen sitoplazmalarında vakuoller görülebilir, merkezde yerleşmeyen iri nukleus eozinofilik yapıda ve düzensiz oval şekillidir. Promonositlerde (Şekil 3.13B) nukleus küçülmeye başlar, olgun monositlerde ise (Şekil 3.13C) hem nukleus hem de hücre başlangıca göre çok daha küçüktür, koyu bazofilik nukleus yuvarlak şekillidir. Bağ dokusuna geçen monositler iri nukleusları ile tipik makrofaj nitelikleri gösterirler, bazen içlerinde fagosite ettikleri diğer hücrelerin nukleus parçacıkları izlenebilir (Şekil 3.13D).



Şekil 3.13 Kontrol grubunda monosit gelişim aşamaları. A: monoblast, B: promonosit, C: monosit, D: Apoptotik bir eozinofili ve diğer kalıntıları sindiren makrofaj. Wright&Giemsa.

3.3.4 Kontrol grubunda melanomakrofajların pigment içerikleri

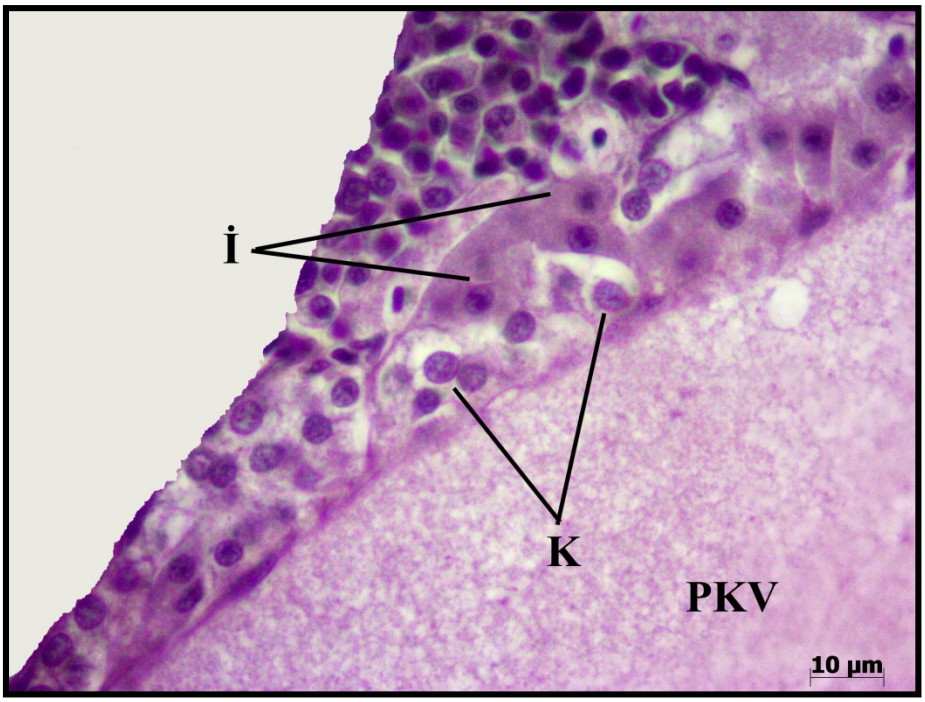
Kontrol grubu örneklerinin melanomakrofaj merkezlerinde farklı madde içerikleri, farklı histolojik ve histokimyasal boyama yöntemleri kullanılarak başlıca melanin, glikojen, protein ve hemosiderin olarak belirlenmiştir (Şekil 3. 14). Buna göre ayırt edici boyama yöntemleri melanin için musikarmin, proteinik içerik için PAF, glikojen içeriği için PAS ve hemosiderin için de Prussian Blue olarak belirlenmiştir.



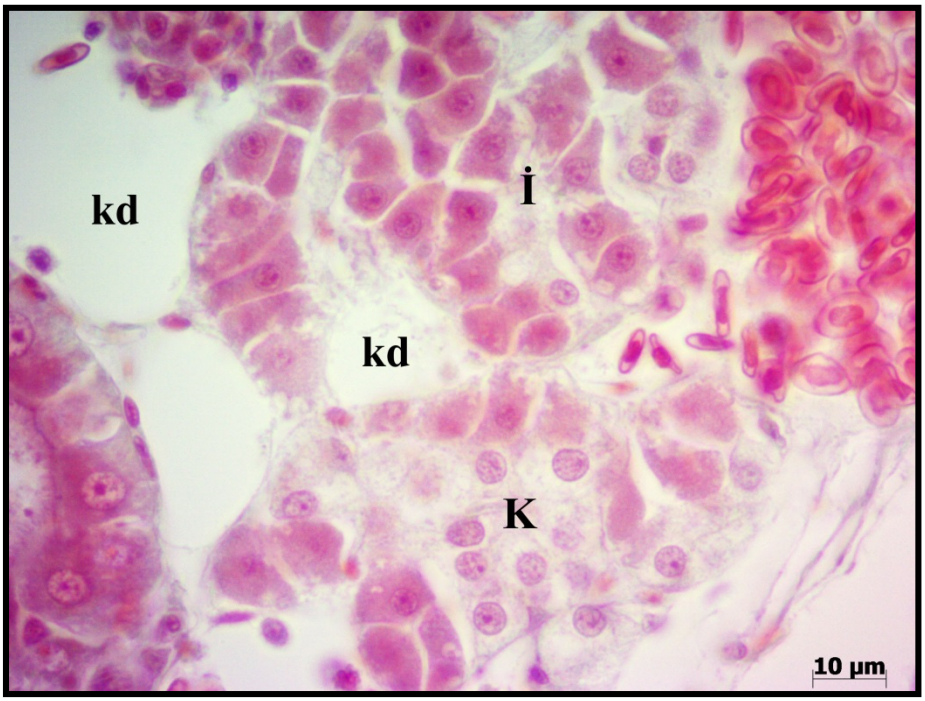
Şekil 3.14 Kontrol grubu melanomakrofaj merkezlerinde farklı madde içerikleri. A: melanin (musikarmin); B: protein (PAF); C: glikojen (PAS); D: hemosiderin (Prussian blue).

3.4 Kontrol Grubunda Baş Böbreğinin Endokrin Elemanları: İnterrenal ve Kromaffin Hücreler

Endokrin hücreler post kardinal vena ve dalları ile kapillerlerin çevresinde yer alırlar (Şekil 3.3 ve 3.6). PAS yöntemiyle interrenal hücreler daha koyu renkte boyanmakta, adeta köşeli sınırları da izlenebilmektedir. Açık renkte boyanan kromaffin hücrelerin sınırları ise seçilemez (Şekil 3.15). MT yöntemiyle boyanan preparatlarda (Şekil 3.16) interrenal hücrelerin poligonal şekilleri ile büyük kromaffin hücre sınırları çok iyi ayırt edilmektedir, interrenal hücrelerde kromatin materyalin belirgin olduğu iri nukleuslar genellikle bir nukleous içerir. Kromaffin hücreler genellikle düzensiz yuvarlak-oval şekillidirler, interrenal hücrelerdekine oranla daha büyük olan yuvarlak nukleuslarında sınırlar düzgün, nukleolus belirgindir (Şekil 3.16).



Şekil 3.15 Post kardinal vena (PKV) çevresinde poligonal interrenal (İ) ve açık renkli kromaffin hücreler (K). PAS.



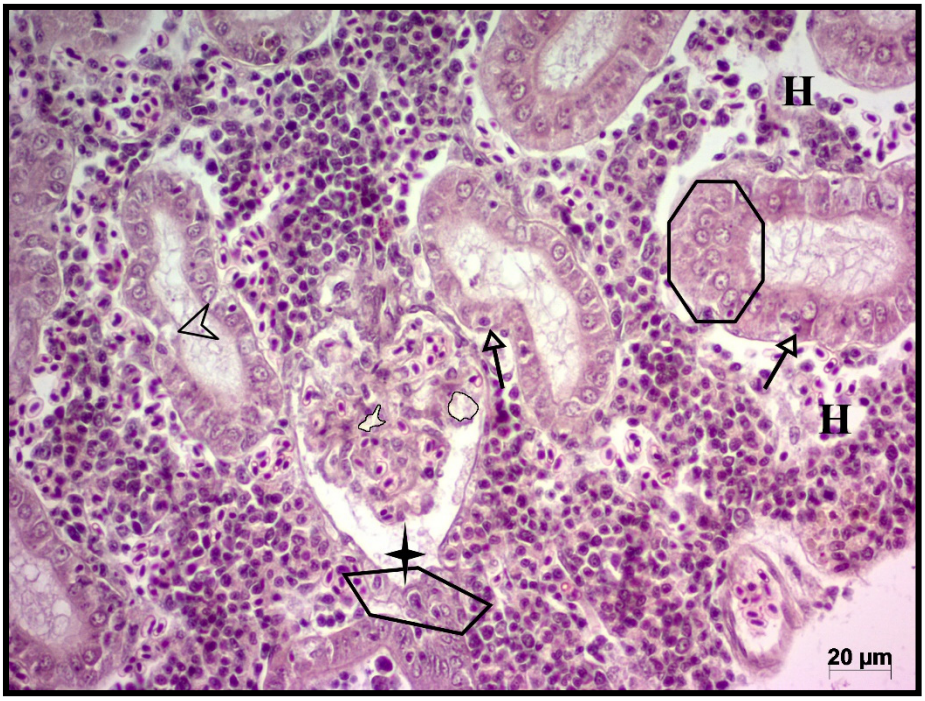
Şekil 3.16 Kan damarları (kd) çevresinde interrenal (İ) ve kromaffin hücreler (K). MT.

3.5 SLS Uygulaması

3.5.1 Renal elemanlar üzerindeki etkiler

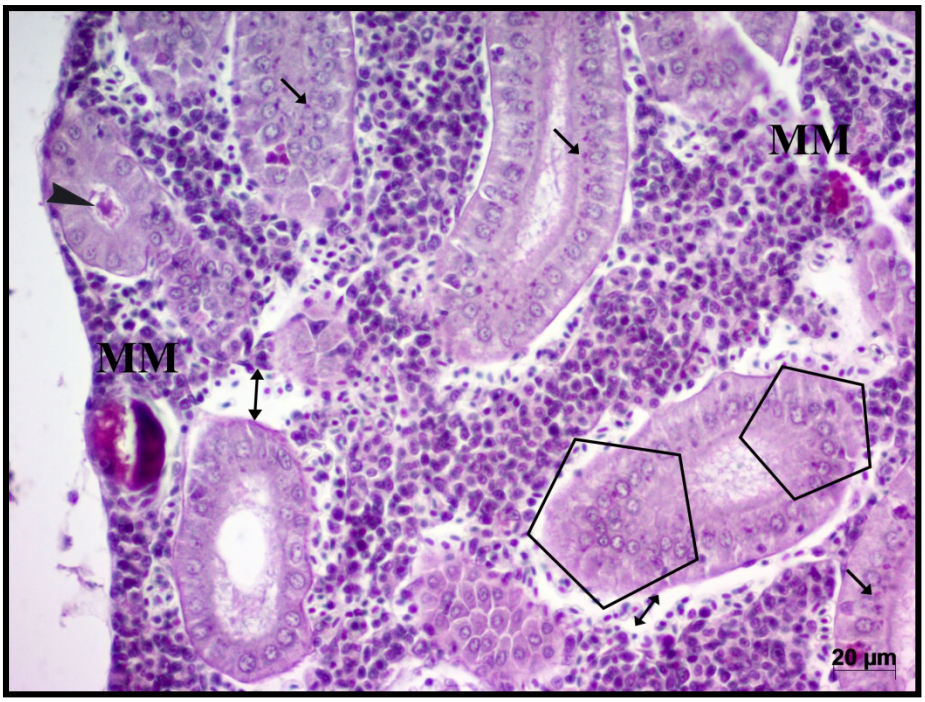
3.5.1.1 3 mg/L deneme grubu

Bu deneme grubunda 96 saatlik SLS uygulamasıyla renal korpüsküllerde hem Bowman alanlarının, hem de glomerular kapillerlerin genişlediği not edilmiştir. Bazı renal tübüllerde belirgin bir bozulma izlenmezken diğer bazılarında epitel hipertrofisi gözlenen tübüller düzgün oval şekillerini kaybetmekte, epitellerinde yer yer vakuoler oluşumlar ve infiltrasyon gözlenmektedir. (Şekil 3.17).



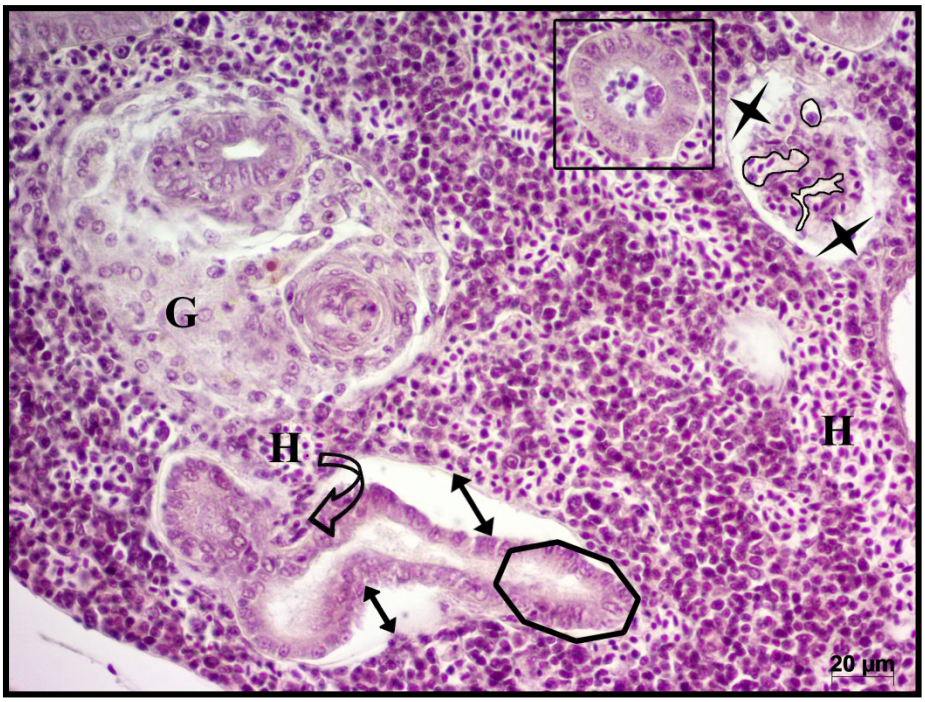
Şekil 3.17 3 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H); ayrıca vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon (içi boş ok). H&E.

Stromadan adeta ayrılmaya başlayan bazı renal tübüllerde epitel hipertrofisi tipiktir. Ayrıca epitel hücrelerinde glikojen benzeri granüller ve tübül lümenlerinde de yer yer bu yapıların yığılımı izlenmiştir (Şekil 3.18).



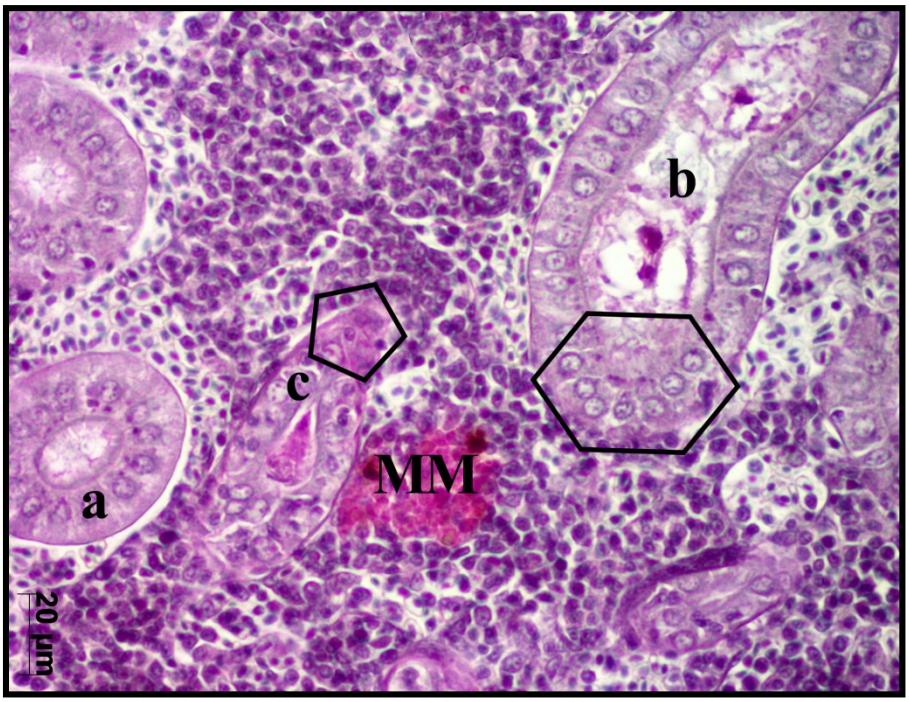
Şekil 3.18 3 mg/L SLS uygulama grubu. Stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübüllerde hipertrofi (çokgen içerisinde) ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); tübül lümeninde glikojen benzeri madde birikimi (ok başı) ile melanomakrofaj merkezleri (MM). PAS.

Hematopoetik dokudaki hemoraji (Şekil 3.17) bazen stromadan ayrılmış ve epiteli de atrofik renal tübül içerisine ilerlemiş halde gözlenmektedir (Şekil 3.19). Hematopoetik dokuda nadiren granülom oluşumları izlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 3 mg/L SLS uygulama grubu. Sağ üstte düzgün yapılı bir renal tübülün (dikdörtgen içerisinde) lümeninde glikojen birikimi; Bowman alanı (yıldızlar) ile glomerular kapilleri (elle çizilmiş) genişlemiş bir renal korpüskül; hematopoetik dokuda hemorajinin (H), stromadan ayrılmış (çift yönlü ok) ve epiteli atrofik (çokgen içerisinde) bir renal tübül içerisine ilerlemesi (ok); ayrıca iri bir granülom (G). H&E.

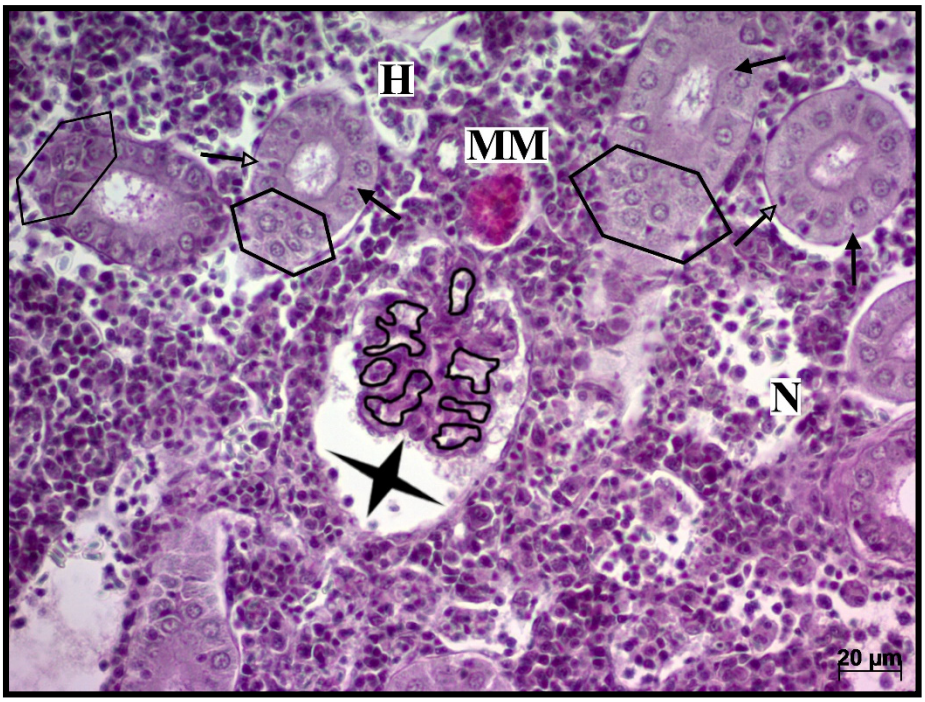
Renal tübüllerin lümeninde glikojen benzeri madde yığılımı farklı aşamalarda izlenebilmektedir (Şekil 3.20, a→c). Granüler yapılaşmalar normal tübül epitel hücrelerinin apikalinde düzgün yuvarlak şekilleriyle rahatça görülebilmektedir. Epiteli hipertrofiye doğru giden tübüllerde ise lümende yer yer düzensiz ve dağınık, ağsı görünümlü birikimler oluşturmaktadır. Birikimler tübül epitelinde belirgin hipertrofi ve düzensizleşme, bozulma izlenen tübüllerde giderek daha kompakt hale geçerler, bu durumun izlendiği tübüllerin hemen yakınında melanomakrofaj merkezleri izlenebilir.



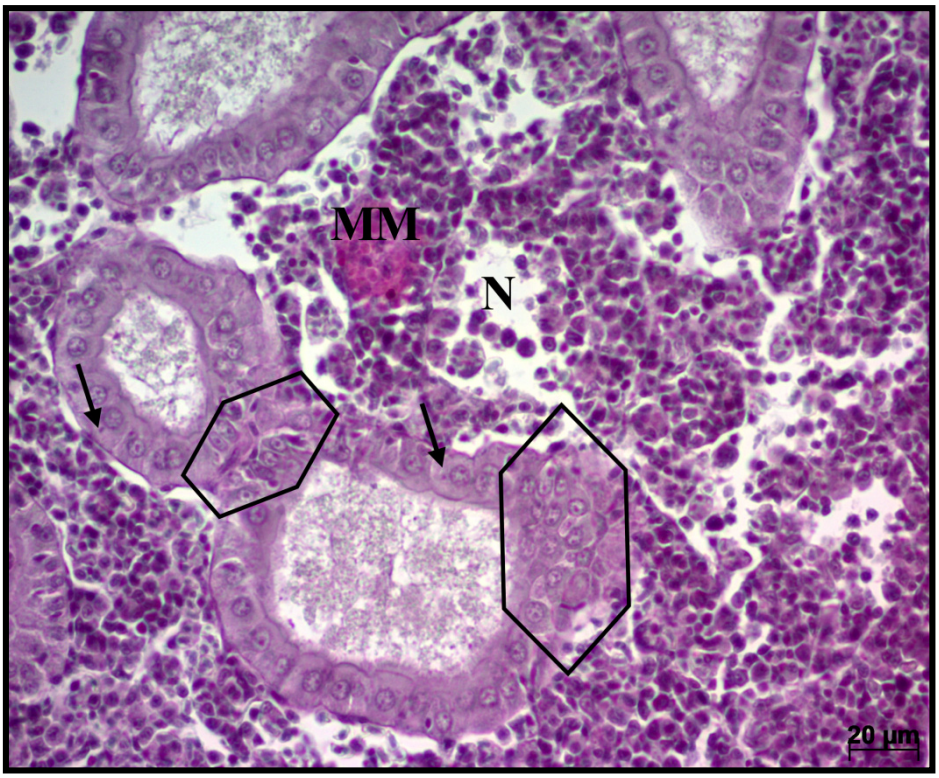
Şekil 3.20 3 mg/L SLS uygulama grubu. Düzgün renal tübül epitelinin apikalinde (a), hafifçe bozulan tübülün lümeninde ağsı görünümde (b) ve yakınında melanomakrofaj merkezi (MM) izlenen bozulmuş renal tübül lümeninde kompakt haldeki (c) granüler yapılaşmalar. PAS.

3.5.1.2 6 mg/L deneme grubu

Renal korpüsküllerin Bowman alanlarında ve glomerular kapillerlerinde genişleme bir önceki deneme grubuna oranla daha sık gözlenmektedir (Şekil 3.21, 23, 24). Düzgün şekillerini yitiren renal tübüllerin stromadan ayrılan hipertrofik epitel hücrelerinde (Şekil 3.22) yer yer vakuoler oluşumlar, parçalanmalar vardır (Şekil 3.23, 24). Ayrıca bu hücrelere doğru infiltrasyon not edilmiştir (Şekil 3.21, 23, 24). Renal tübül epitel hücrelerinde bir önceki deneme grubundakilere göre daha az gözlenen glikojen benzeri granüllerin tübül lümenlerinde oluşturduğu ağsı görünüm (Şekil 3.22) bazı kesitlerde daha kompakt haldedir (Şekil 3.24).

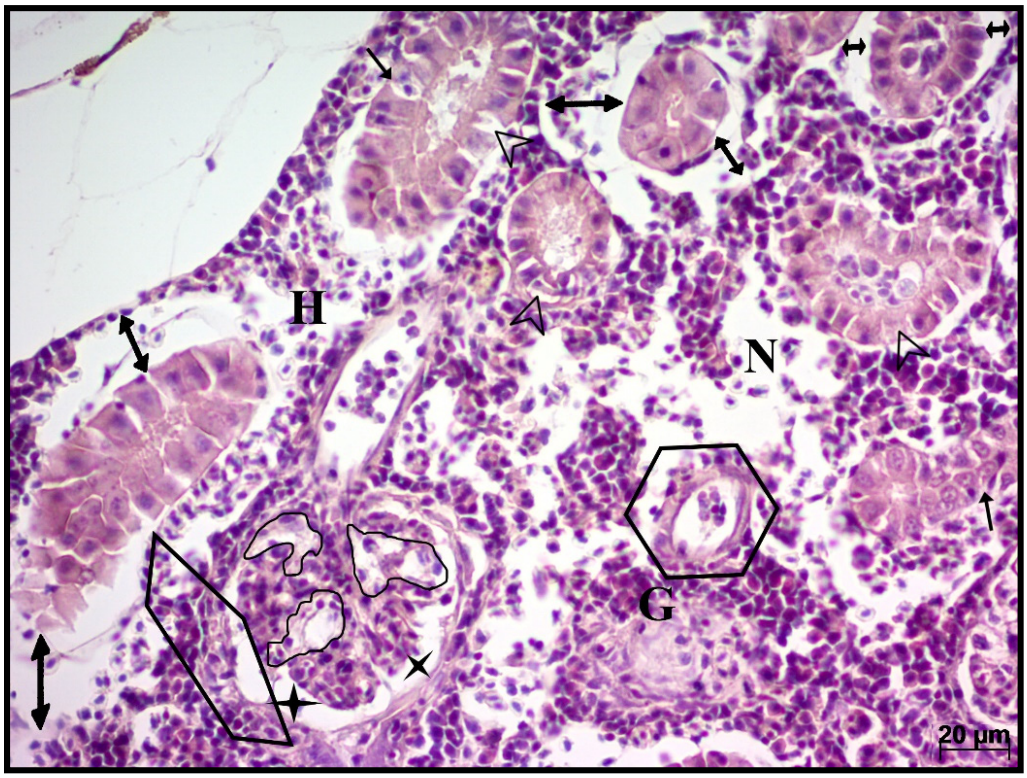


Şekil 3.21 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde) ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); hematopoetik dokuda hemoraji (H); ayrıca nekrotik bölgeler (N) ve infiltrasyon (içi boş ok) ile melanomakrofaj merkezi (MM). PAS.

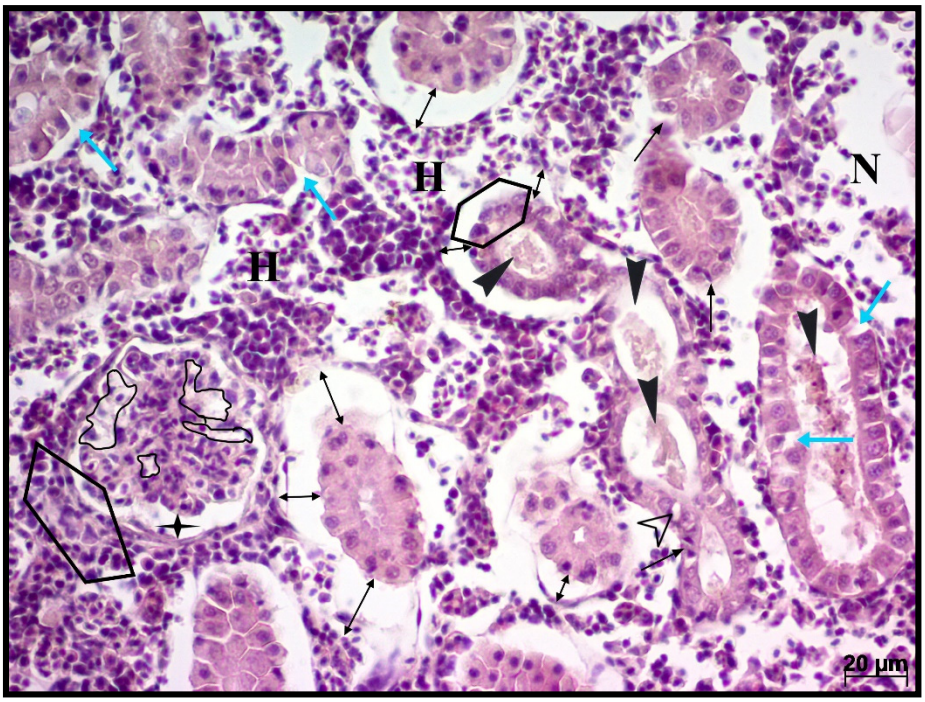


Şekil 3.22 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), ve tübül epitelinde glikojen benzeri granüller (oklar); hematopoetik dokuda nekrotik bölgeler (N) ile melanomakrofaj merkezi (MM). PAS.

Yer yer hemoraji ve nekroz izlenen, dağınık ve boşluklu görünümüyle hipersellüler niteliğini yitiren hematopoetik dokuda (Şekil 3.21-24) melanomakrofajlar (Şekil 3.21, 22) ve küçük granülom oluşumları (Şekil 3.23) gözlenmiştir.



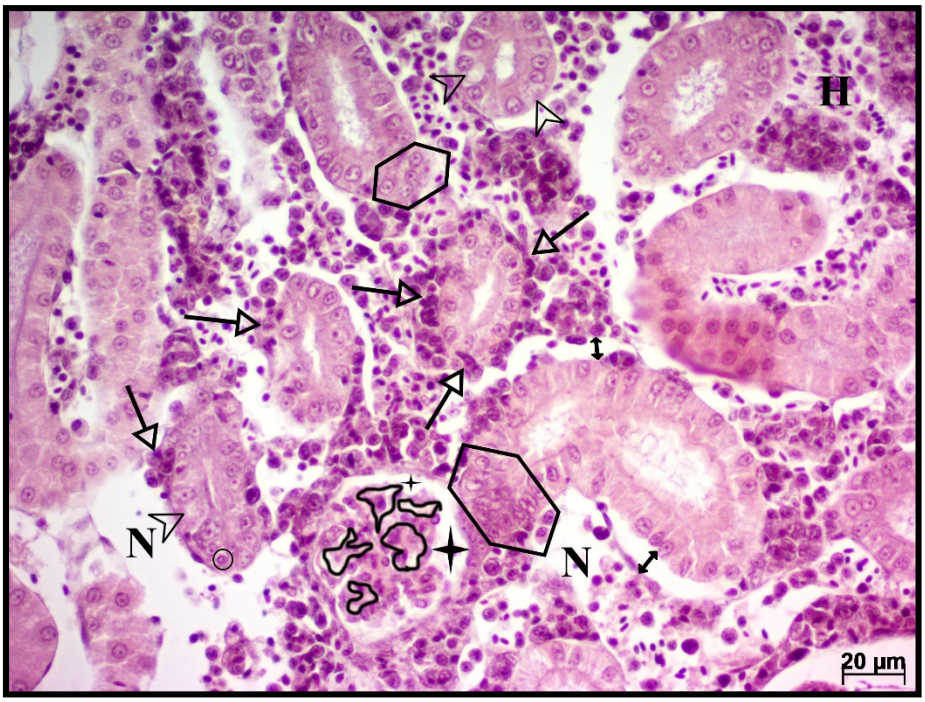
Şekil 3.23 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde, vakuolizasyon (içi boş ok başı), infiltrasyon (içi boş ok) ve küçük bir granülom (G). H&E.



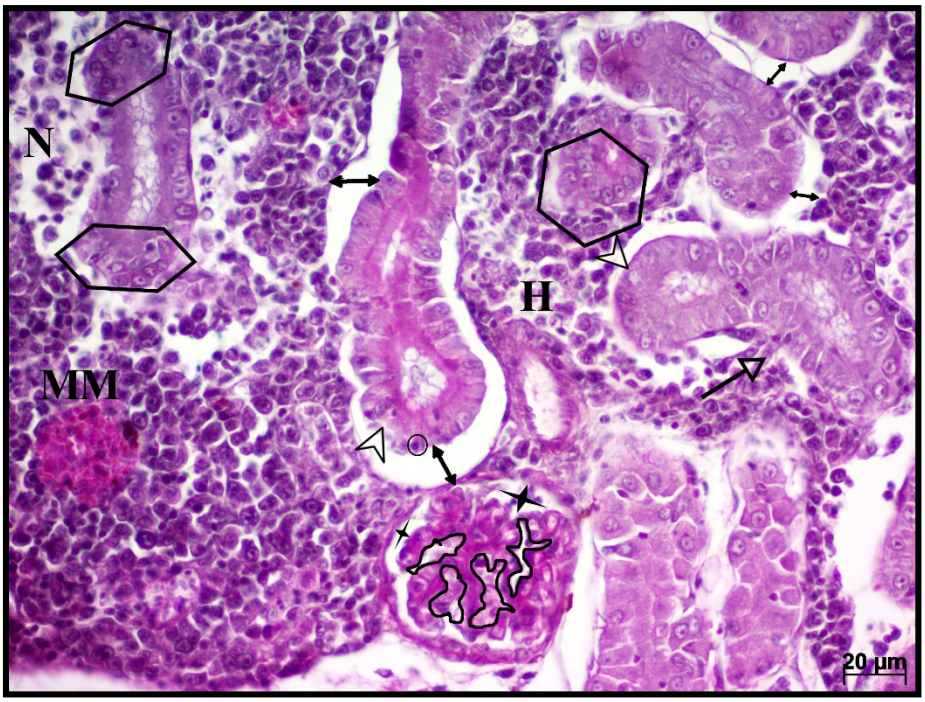
Şekil 3.24 6 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanında (yıldız) ve glomerular kapillerlerinde (elle çizilmiş) genişleme; pariyetal tabakada hipertrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde, ayrılmalar (mavi oklar) vakuolizasyon (içi boş ok başı), infiltrasyon (içi boş ok) ve tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı). H&E.

3.5.1.3 9 mg/L deneme grubu

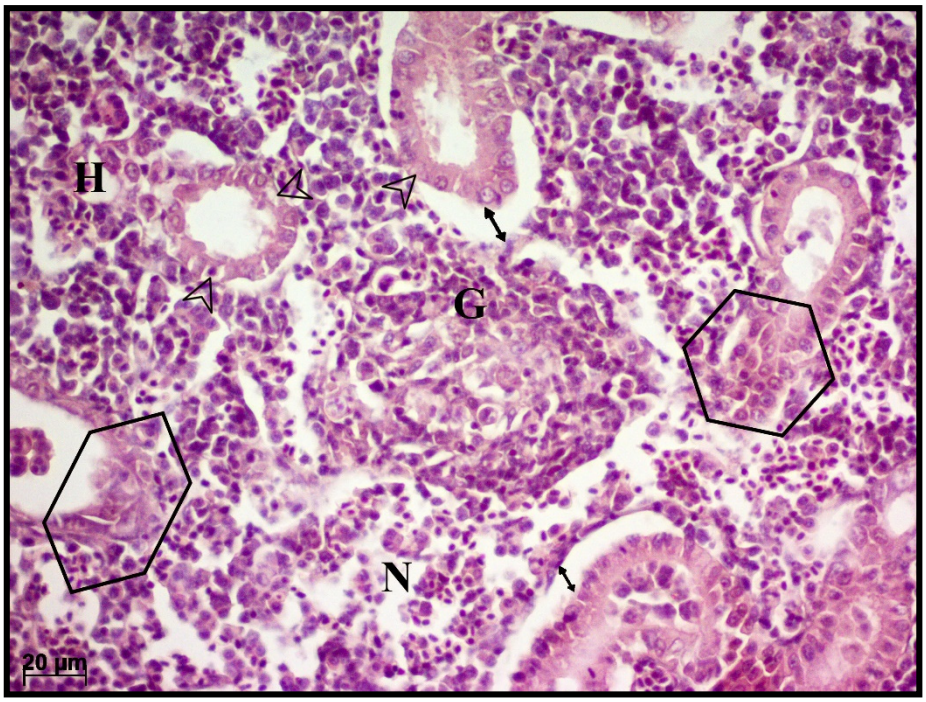
Renal korpüsküllerin Bowman alanlarında ve glomerular kapillerlerinde, önceki deneme gruplarında gözlenen genişlemenin devam etmediği önemle kaydedilmiştir (Şekil 3.25, 26). Yine düzgün şekilli olmayan ve stromadan ayrılmış halde gözlenen renal tübüllerin epitelinde infiltrasyon yoğun ve çarpıcıdır (Şekil 3.25). Sıklıkla hipertrofi, ayrıca vakuoller ve nadiren görülen piknotik nukleuslar (Şekil 3.25,26) ile karakterize edilen atrofi izlenmiştir (Şekil 3.25-30).



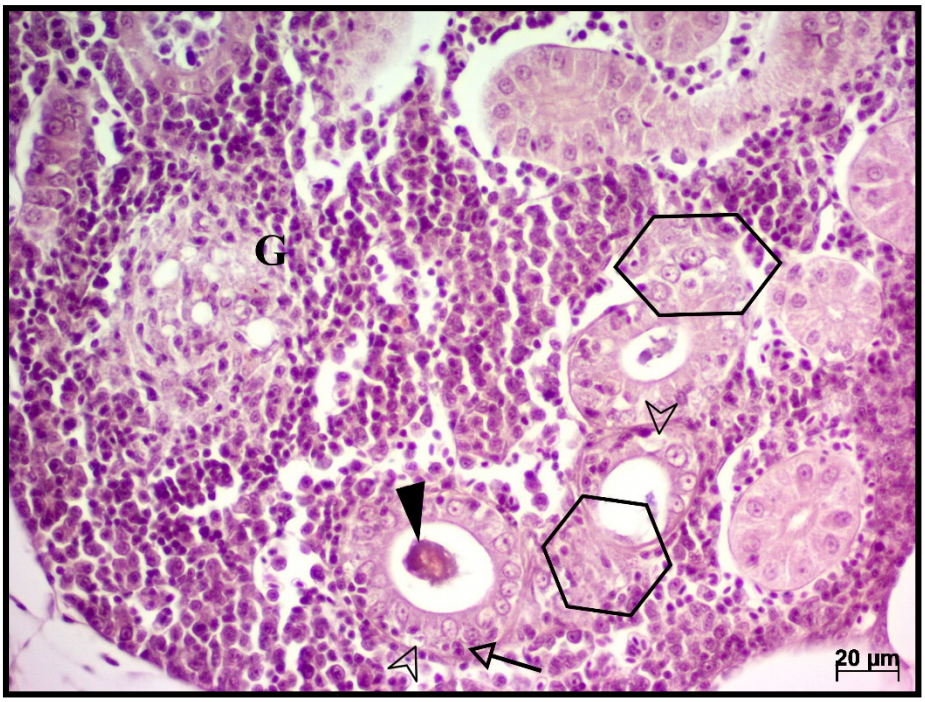
Şekil 3.25 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanı (yıldız) ve glomerular kapillerleri (elle çizilmiş); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), vakuolizasyon (içi boş ok başı), piknotik nukleus (daire içerisinde) ve infiltrasyon (içi boş ok); hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N). H&E.



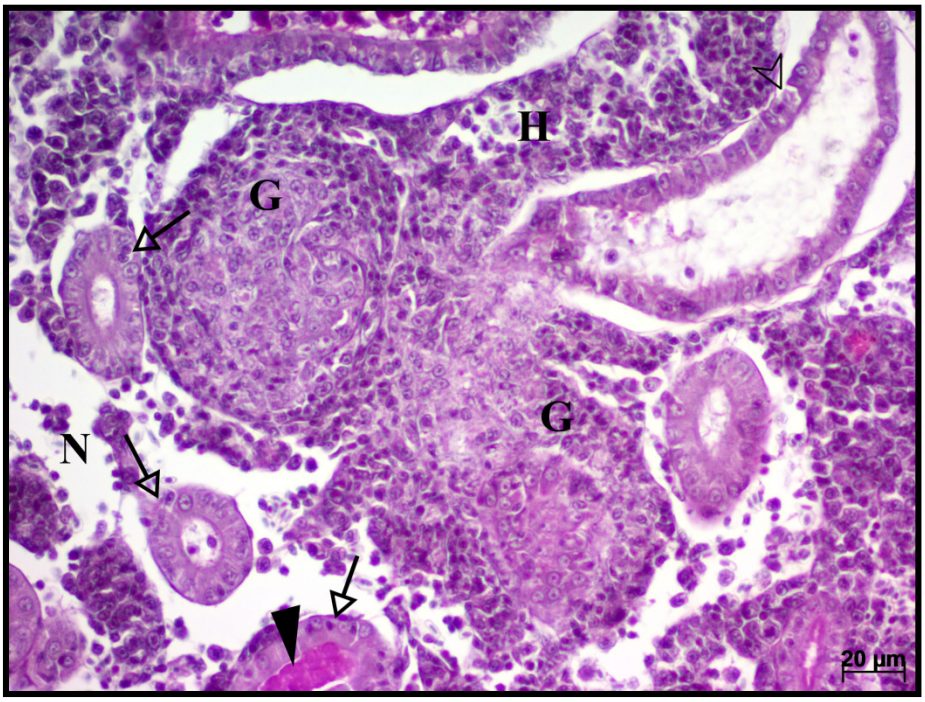
Şekil 3.26 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal korpüsküllerin Bowman alanı (yıldız) ve glomerular kapillerleri (elle çizilmiş); renal tübül epitelinde hipertrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); ayrıca stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), piknotik nukleus (daire içerisinde) ve infiltrasyon (içi boş ok) ve hematopoetik dokuda melanomakrofaj merkezi (MM). PAS.



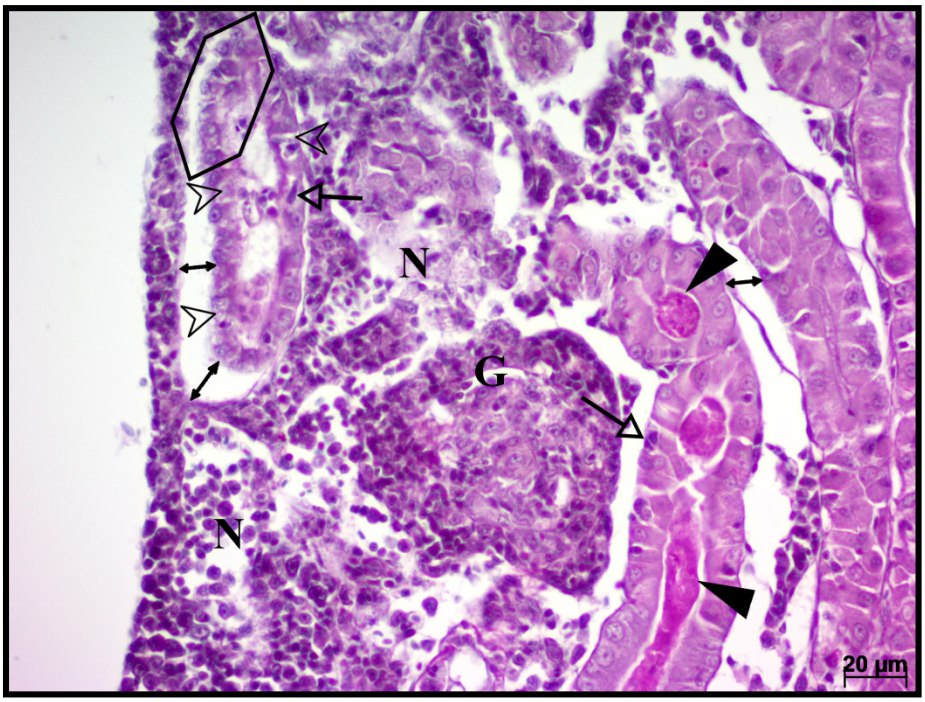
Şekil 3.27 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). H&E.



Şekil 3.28 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). H&E.



Şekil 3.29 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); hemoraji (H) ve nekrotik bölgeler (N); hematopoetik dokuda iki büyük granülom (G). PAS.

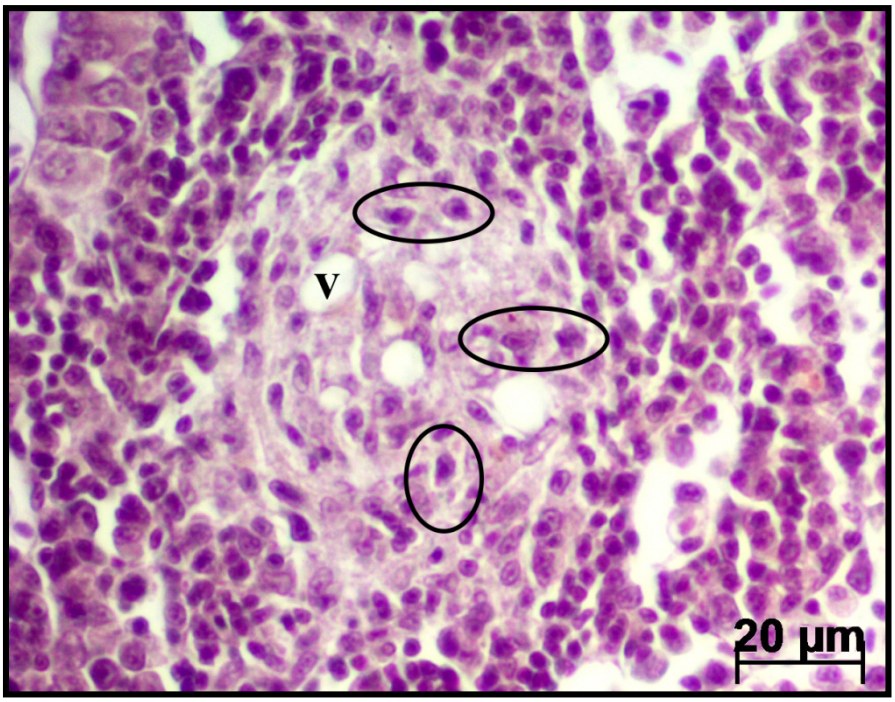


Şekil 3.30 9 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), hematopoetik dokuda nekrotik bölgeler (N); stromadan ayrılmış (iki yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı), tübül lümeninde kompakt halde madde birikimi (ok başı); infiltrasyon, hematopoetik dokuda büyük bir granülom (G). PAS.

Hematopoetik dokuda melanomakrofaj merkezleri daha fazla sayıdadır (Şekil 3.32). Hemoraji ve nekroz devam etmekte, büyük granülomlar çok dikkat çekmektedir (Şekil 3.25-3.30).

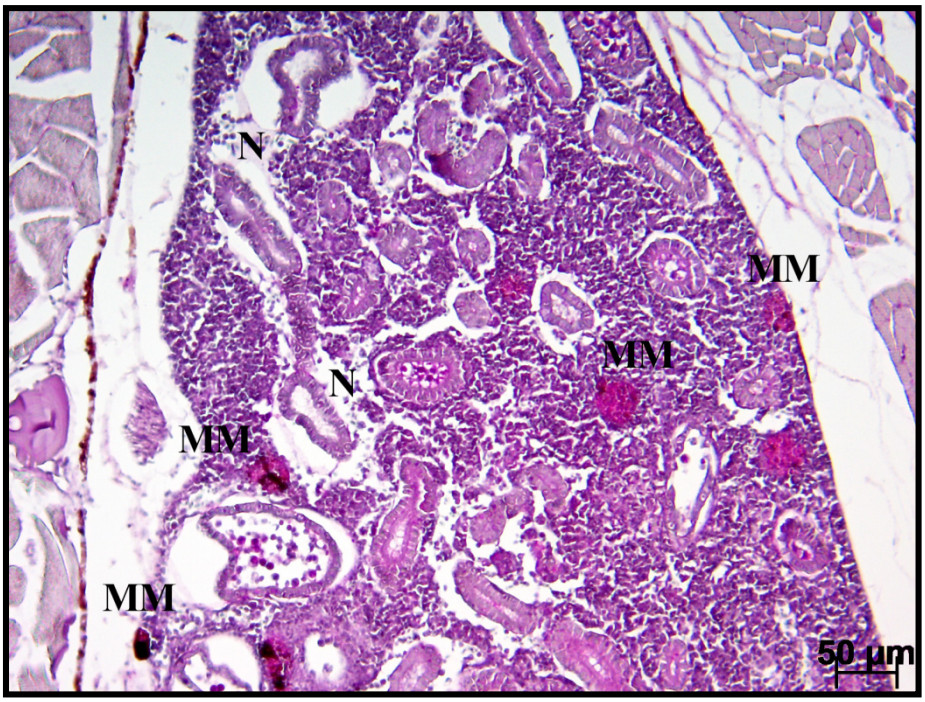
Stromadan ayrılmış halde olmalarına rağmen çevrelerinde herhangi bir sınır gözlenemeyen granülomlar farklı boyutlarda, helozon benzeri oluşumlardır. Bazılarının içerisinde vakuoller bulunabilir. Epitel kökenli, küçük nukleuslu hücrelerin çoğunlukta olduğu bu yapılaşmalarda makrofaj benzeri iri hücreler de gözlenebilir (Şekil 3.31).

Renal tübül epitel hücrelerinde, bir önceki uygulama grubunda göreceli olarak daha az gözlenen glikojen benzeri granüllere, 9 mg/L SLS uygulanan grupta rastlanmamıştır. Renal tübül lümenlerinde daha önceki uygulama gruplarında izlenen düzensiz ve dağınık, ağsı görünüm de yerini tamamen kompakt hale bırakmıştır (Şekil 3.29 ve 3.30).



Şekil 3.31 9 mg/L SLS uygulama grubu. Granülom içerisinde vakuoller (v), küçük nukleuslu hücreler arasında makrofaj benzeri hücreler (elips içerisinde). H&E.

Tüm bu bulguların paralelinde hematopoetik dokuda melanomakrofaj merkezlerin sayısında da belirgin bir artış izlenmektedir (Şekil 3.32).

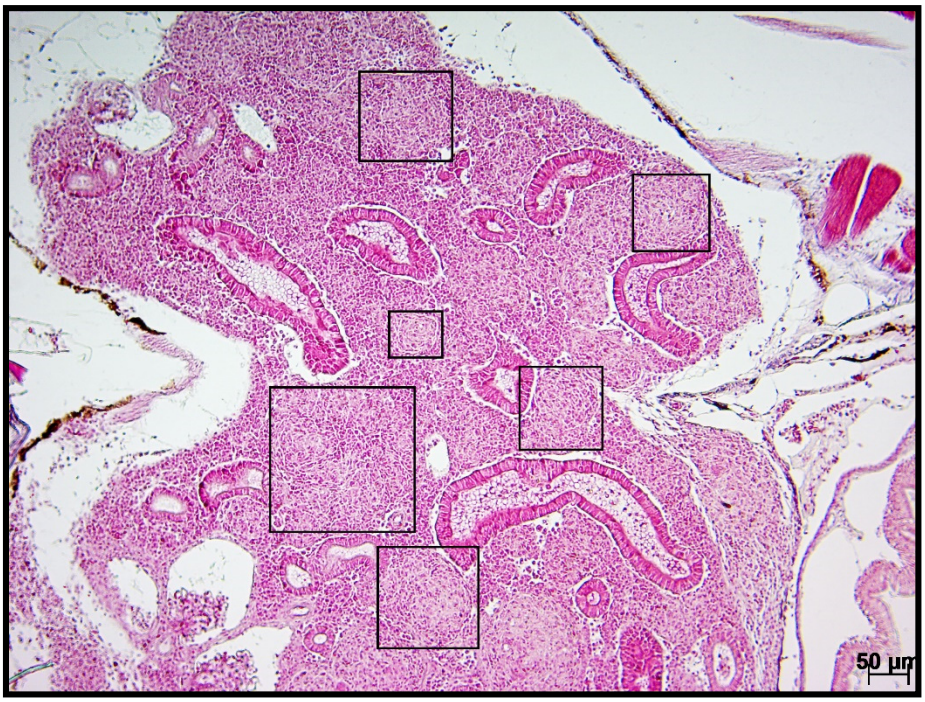


Şekil 3.32 9 mg/L SLS uygulama grubu. Hematopoetik doku genel görünümde melanomakrofaj merkezleri (MM). PAS.

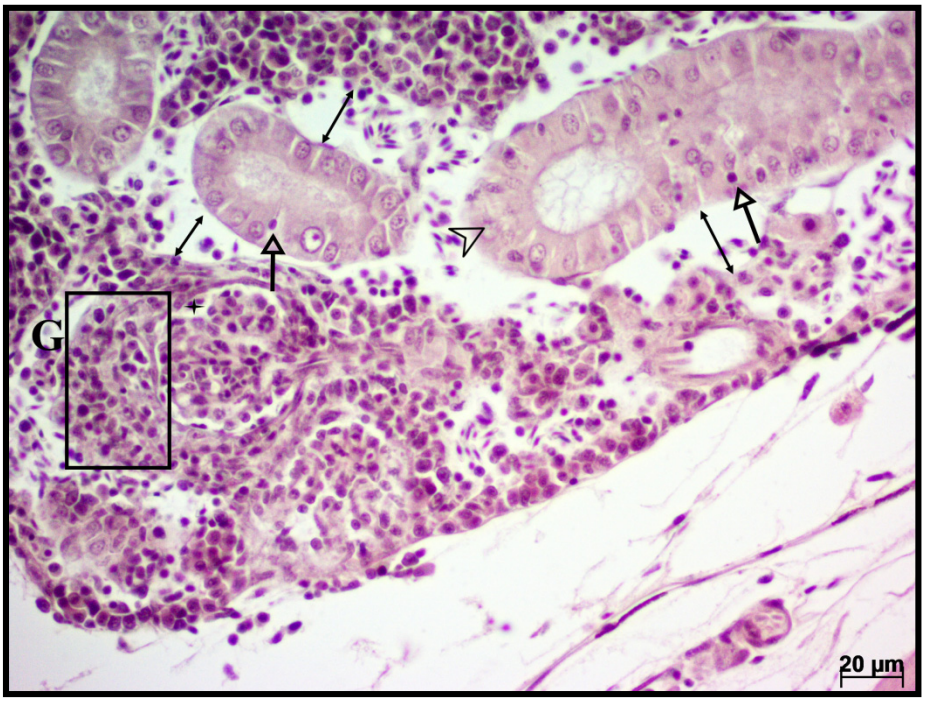
3.5.1.4 12 mg/L deneme grubu

Bu deneme grubunda genel görünüm çarpıcı biçimde bozulmuştur. Renal tübüller belirgin biçimde deforme ve renal korpüsküller de seçilemez haldedir, doku neredeyse tümüyle granülomlar tarafından istila edilmiş gibi görülmektedir (Şekil 3.33).

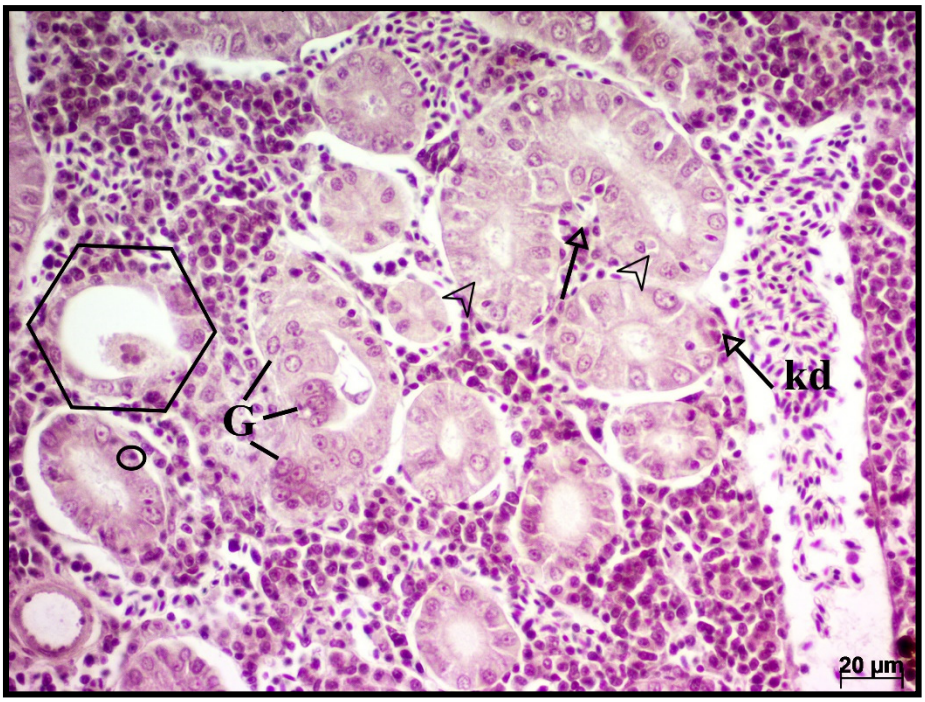
Ayrıntılı incelemelerde granülomlara yakın konumlanan bazı renal korpüsküllerin Bowman alanları daralmış gibidir; düzgün şekillerini tamamen kaybetmekte olan ve epitellerinde hipertrofi, vakuolizasyon ve atrofi gözlenen renal tübüller stromadan belirgin olarak ayrılmıştır, infiltrasyon yoğundur, ayrıca piknotik nukleuslara rastlanmıştır (Şekil 3.34 ve 3.35).



Şekil 3.33 12 mg/L SLS uygulama grubu. Genel görünümde renal tübüllerin arasında çok sık rastlanan granülomlar (elle çizilmiş). MT.

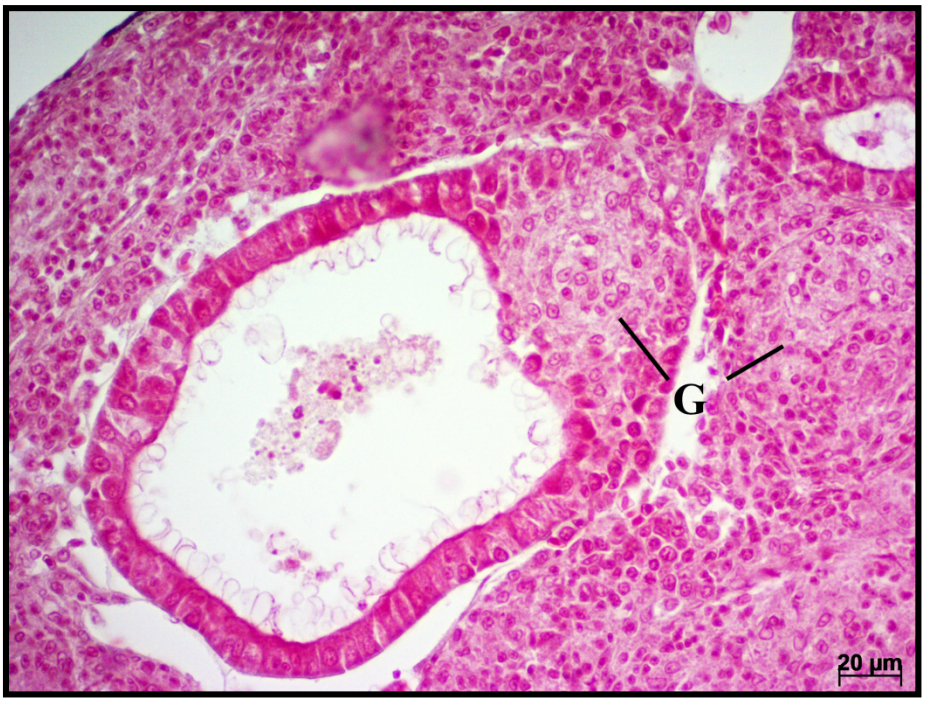


Şekil 3.34 12 mg/L SLS uygulama grubu. Stromadan ayrılan (çift yönlü ok) renal tübül epitelinde vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon; hematopoetik dokuda granülomlar (G). H&E.



Şekil 3.35 12 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde atrofi (çokgen içerisinde), piknotik nukleus (daire içerisinde), vakuolizasyon (içi boş ok başı) ve infiltrasyon; hematopoetik dokuda renal tübülün yapısını bozan granülomlar (G). H&E.

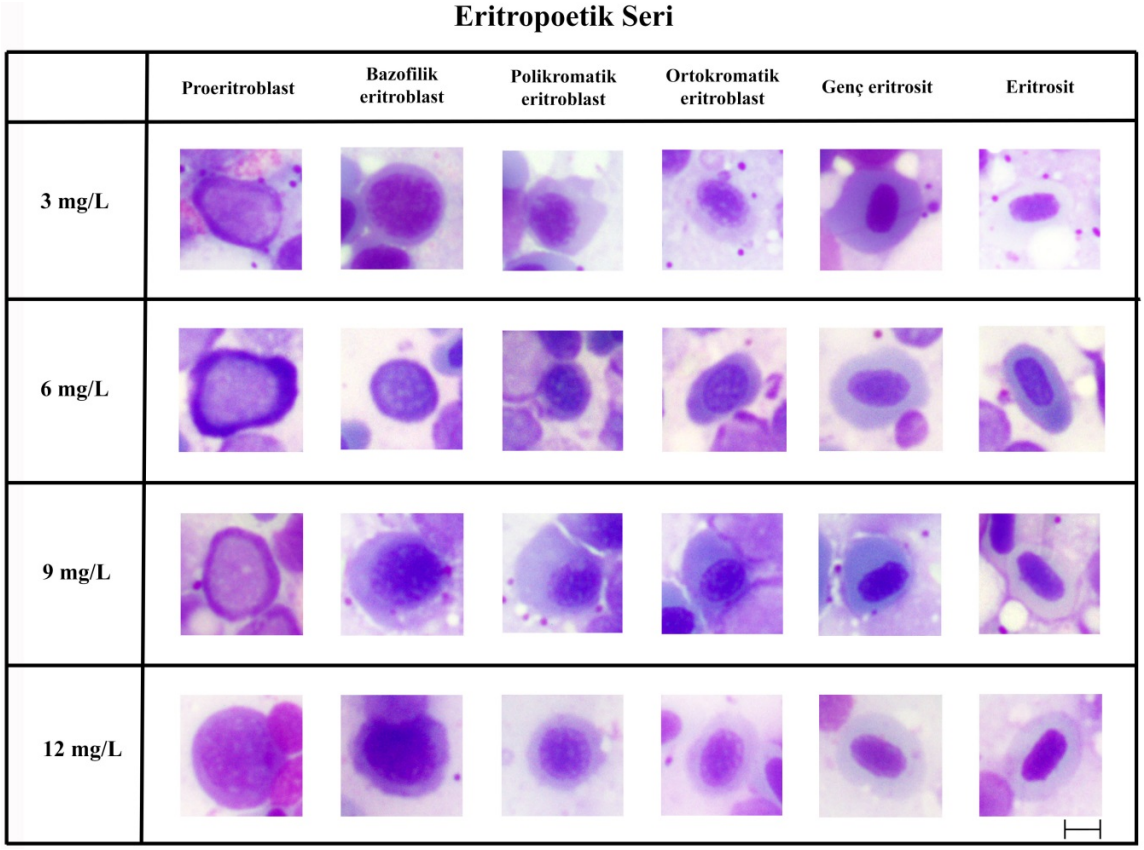
Renal tübül epitelinde granülom oluşum aşamaları izlenebilmektedir. Önce az sayıda hücrede gözlenen değişim (Şekil 3.35) giderek epitel içerisinde yaygınlaşmakta ve kompakt yapılı, helozon benzeri granüloma dönüşmektedir (Şekil 3.36). Bu dönüşüm sürecinde granülom merkezinden uzakta kalan ve bozulmaya doğru giden hücrelerden, sınırları seçilebilenler tipik biçimde hipertrofiktir.



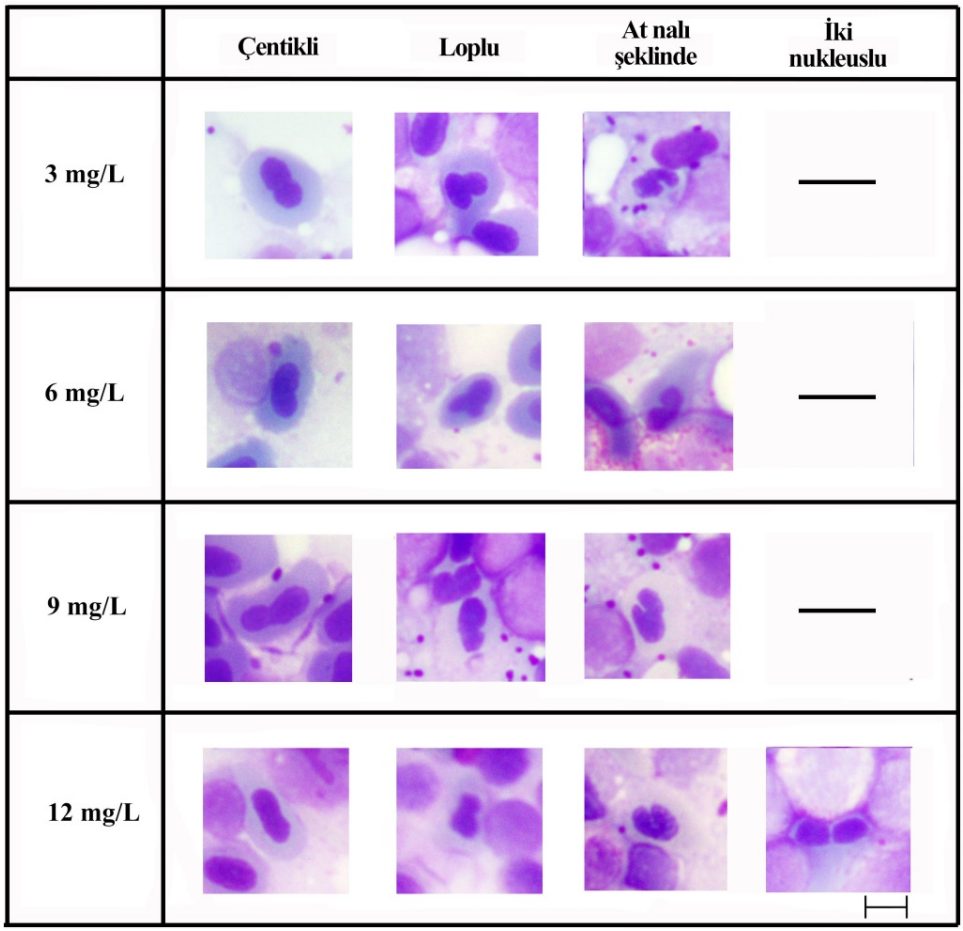
Şekil 3.36 12 mg/L SLS uygulama grubu. Renal tübül epitelinde helozon benzeri granülom oluşumu (G), ayrıca hipertrofik hücreler. MT.

3.5.2 Hematopoetik elemanlar üzerindeki etkiler

Yayma preparatlarda eritropoetik seri elemanları (Şekil 3. 37) ile granüllü lökositlerden eozinofil serisinin tüm elemanları (Şekil 3. 39); bütün uygulama gruplarında ayırt edilebilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, uygulama sonucunda eritrosit farklılaşma aşamalarında herhangi bir fark belirlenmemiştir. Ancak olgun eritrosit nukleuslarındaki bazı değişimler dikkat çekmektedir (Şekil 3.38). Bütün uygulama gruplarında, eritrositlerde loplu, çentikli ve at nalı şeklinde nukleuslar yer almaktadır. Ancak tomurcuklanma ve mikronukleus oluşumu görülememiştir.

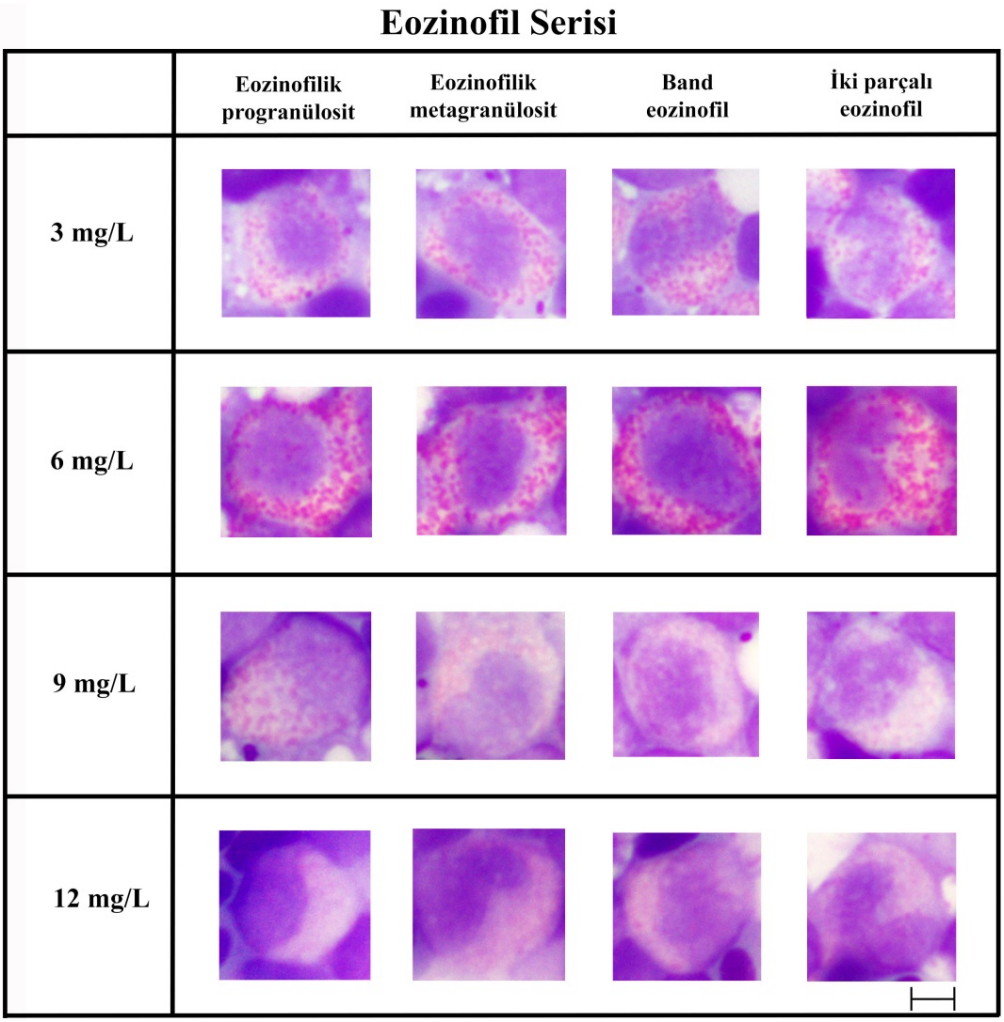


Şekil 3.37 Uygulama gruplarında eritropoetik seri.



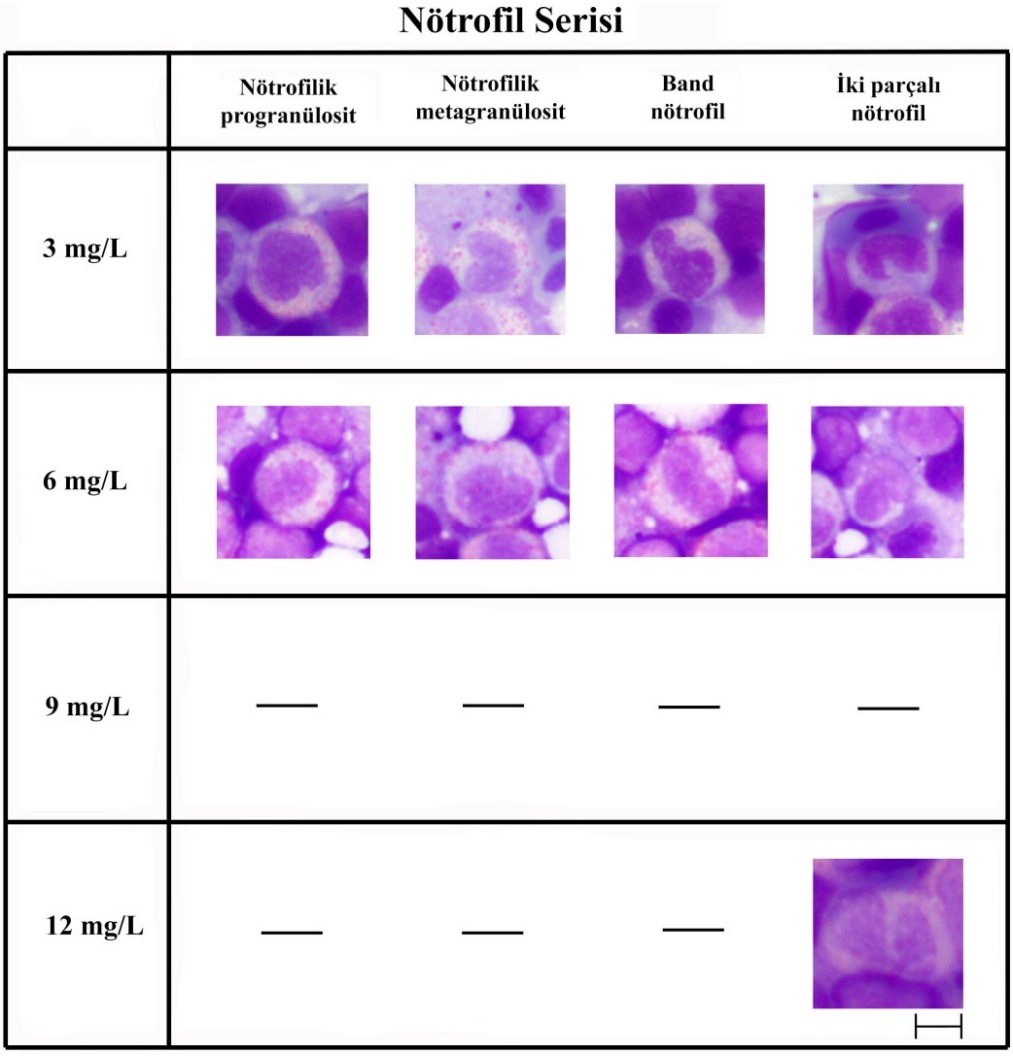
Şekil 3.38 Uygulama gruplarında olgun eritrosit nukleuslarında şekil değişimleri.

Eozinofil serisi bütün uygulama gruplarında tam olarak izlenmektedir (Şekil 3.39). Bu seride uygulama sonucu izlenen önemli farklılık, değişik olgunlaşma aşamalarındaki elemanlarına tüm gruplarda daha sık rastlanmasıdır.



Şekil 3.39 Uygulama gruplarında eozinofil serisi.

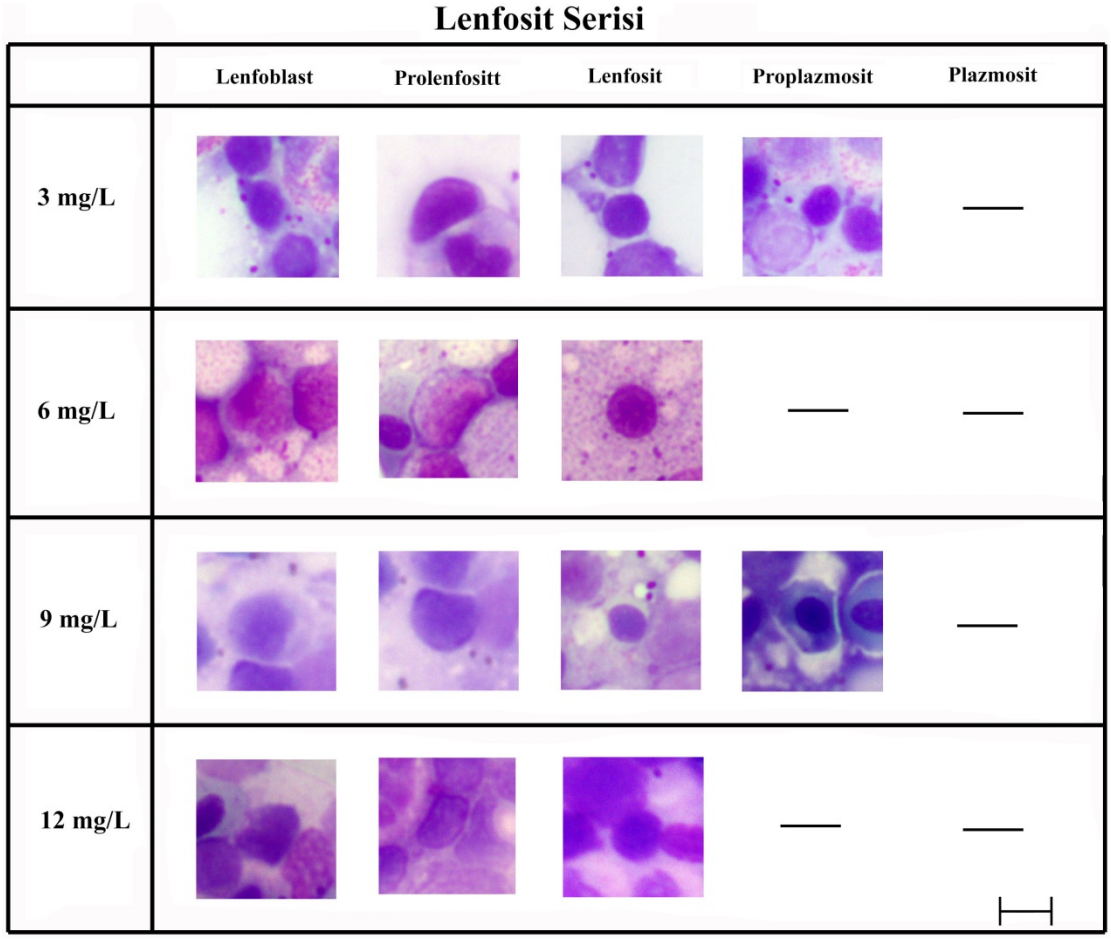
Granüllü lökositler-nötrofil serisinin 3 ve 6 mg/L uygulama gruplarında tüm elemanları seçilebilirken, 9 mg/L uygulama grubunda hiçbir olgunlaşma aşaması izlenememiş, 12 mg/L uygulama grubunda ise sadece iki parçalı nötrofil aşaması kaydedilebilmiştir (Şekil 3.40). İzlenebilen seri elemanlarında SLS uygulamasından kaynaklanan herhangi bir değişim yoktur.



Şekil 3.40 Uygulama gruplarında izlenebilen nötrofil serisi.

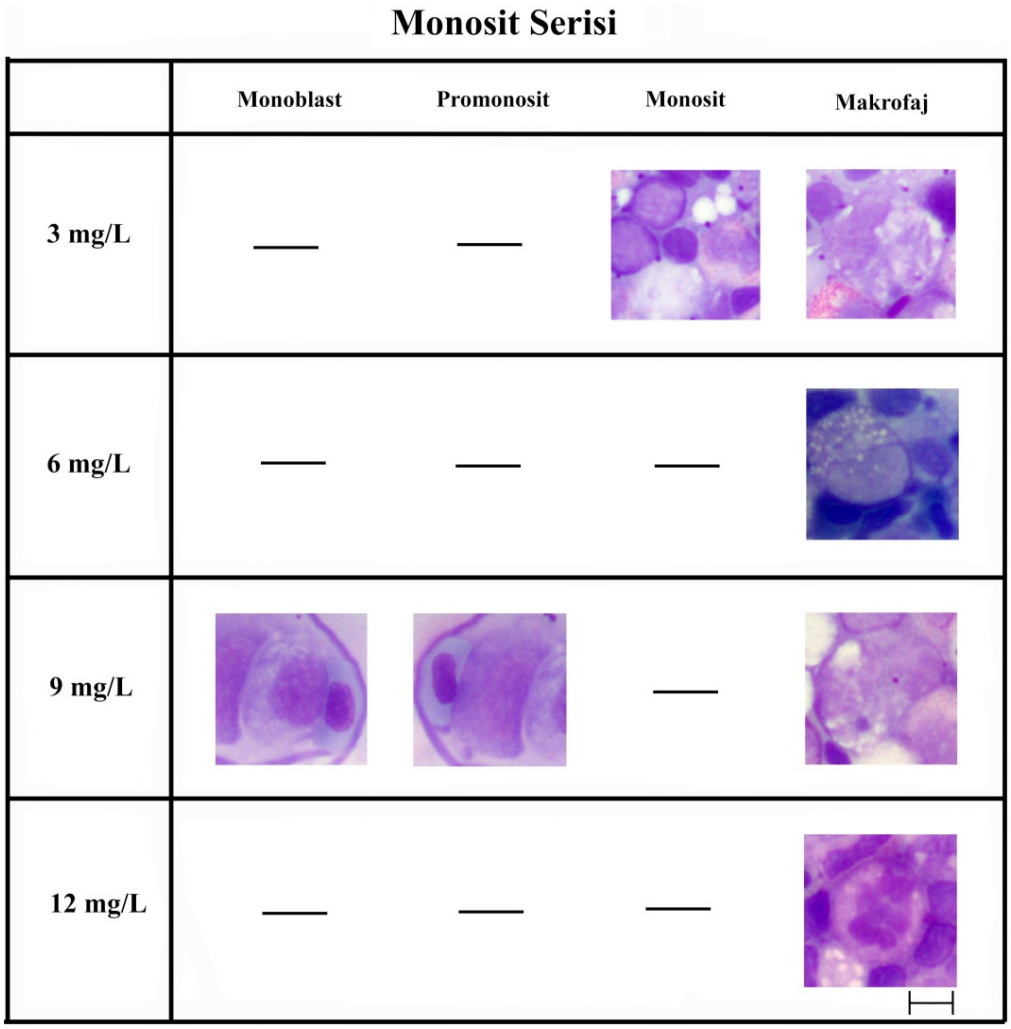
Kontrol grubunda olduğu gibi SLS uygulama gruplarında da bazofilik hücre serileri ayırt edilememiştir.

Granülsüz lökositlerden lenfosit serisinde, kontrol grubunda gözlenebilen ancak uygulama gruplarında izlenemeyen bazı gelişim aşamaları vardır. 3 mg/L uygulama grubunda plazmosit dışında tüm elemanlar gözlenmiştir. 6 mg/L uygulama grubunda da proplazmosit ve plazmositler seçilemiştir. Plazmositler 9 mg/L uygulama grubunda da ayırt edilememiştir. En yüksek konsantrasyondaki (12 mg/L) uygulama grubunda ise lenfoblast, prolenfosit ve lenfosit elemanları izlenebilmiştir (Şekil 3.41). Gözlenebilen seri elemanlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında herhangi bir hücresel farklılık bulunmamıştır.



Şekil 3.41 Uygulama gruplarında izlenebilen lenfosit serisi.

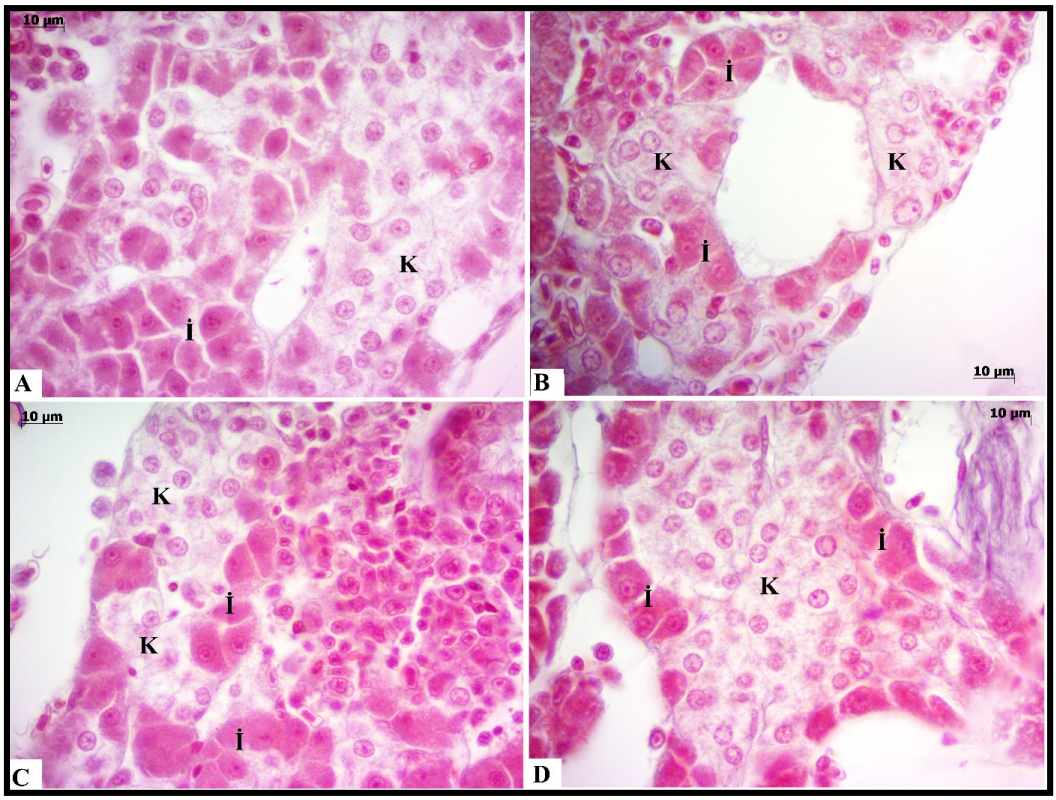
Granülsüz lökosit serilerinden monosit serisinde de lenfosit serisine benzer olarak bazı gelişim aşamalar izlenememiştir. 3 mg/L uygulama grubunda, serinin monosit ve makrofajlar dışındaki elemanları ayırt edilememiştir. 6 mg/L uygulama grubunda sadece makrofajlar, 9 mg/L uygulama grubunda monosit dışında tüm elemanlar, 12 mg/L uygulama grubunda ise yine sadece makrofajlar gözlenebilmiştir (Şekil 3.42).



Şekil 3.42 Uygulama gruplarında monosit serisi.

3.5.3 Endokrin elemanlar üzerindeki etkiler

Mikroskobik gözlemler, SLS uygulaması yapılan tüm deneme gruplarında baş böbreğinin endokrin elemanlarında herhangi bir değişim olmadığını ortaya koymuştur (Şekil 3.43). Ancak bu gözlemlerle yetinilmemiş ve istatistiksel değerlendirmeler bölümünde ayrıca, kromaffin ve interrenal hücrelerin hücre çapları ve nukleus çapları da ele alınmıştır.



Şekil 3.43 Uygulama gruplarında endokrin elemanlar. A. 3mg/L SLS uygulama grubu; B. 6 mg/L SLS uygulama grubu; C. 9 mg/L SLS uygulama grubu; D. 12 mg/L SLS uygulama grubu. K: Kromaffin hücreler, İ; İnterrenal hücreler.

3.5.4 İstatistiksel değerlendirmeler

Baş böbreğinin tartışmalı renal işlevleri ve SLS'nin bu işlevler üzerindeki etkileri bağlamında renal korpüskülerde gözlenen değişimlerin ayrıca istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla; kontrol ve deneme gruplarında glomerulus çapları ve Bowman boşluğu ölçülerek veri analizleri yapılmıştır.

SLS uygulamalarını takiben çeşitli boyama yöntemleriyle yapılan ışık mikroskobu incelemelerinde herhangi bir histopatolojik değişim sergilemeyen interrenal ve kromaffin hücrelerde, hücre ve nukleus çaplarının ölçümleri de; baş böbreğinin endokrin işlevleri uzantısında yine istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

3.5.4.1 Glomerulus çapları

Baş böbreğinde glomerulus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 3.2'de sunulmaktadır. Bu parametre kontrol grubunda ortalama 52,653 µm olarak ölçülmüştür. Ortalama çap değerleri ilk iki uygulama grubunda kontrole göre artmakta, üçüncü uygulama grubunda düşüş gösterdikten sonra 12mg/L SLS uygulanan son grupta 53,712 µm olarak ölçülmektedir.

Çizelge 3.2 Glomerulus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer.

GLOMERULUS ÇAPI		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	51	52,653	34,23	74,69	8,006	1,121	50,402	54,905
	3 mg/L	51	55,487	20,27	77,03	10,659	1,492	52,489	58,485
	6 mg/L	51	57,955	8,35	117,47	15,761	2,207	53,522	62,388
	9 mg/L	51	49,350	32,01	63,45	7,213	1,010	47,321	51,379
	12 mg/L	51	53,712	14,48	82,13	12,749	1,785	50,126	57,296
	Toplam	255	53,831	8,35	117,47	11,593	0,726	52,402	55,261

Histolojik gözlemlerle genel anlamda uyum sağlayan bu değerlerin aralarındaki farkın azlığı, Çizelge 3.2'de verilen Levene testi sonuçlarında da izlendiği üzere verilerin homojen olduğunu göstermektedir ($p>0.05$).

Çizelge 3.3 Glomerulus çap verileri için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; <0,05

İstatistik	df1	df2	P
2,988	4	250	0,020

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerine ilişkin olarak uygulanan iki ayrı test sonucu ise Çizelge 3.3'de sunulmuştur. Shapiro-Wilk testi sonuçları, kontrol ve 9 mg/L deneme grubuna ait verilerin normal dağılım gösterdiğini ($p>0,05$); diğer deneme gruplarında dağılımın normal olmadığını ortaya koymuştur ($p<0,05$). Bu durum karşısında, izlenen farklılıkların anlamlı

olup olmadığı ayrıca Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiş (Çizelge 3.4) ve anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 3.4 Glomerulus çap verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**P**	İstatistik	**P**
GRUPLAR	**Kontrol**	51	0,115	**0,088**	0,974	**0,333**
	3 mg/L	51	0,113	**0,099**	0,953	**0,042**
	6 mg/L	51	0,137	**0,018**	0,880	**0,000**
	9 mg/L	51	0,086	**0,200**	0,979	**0,482**
	12 mg/L	51	0,167	**0,001**	0,946	**0,021**

Çizelge 3.5 Glomerulus çap verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	115,45	4	26,648	0,000
3 mg/L	143,48			
6 mg/L	159,12			
9 mg/L	89,79			
12 mg/L	132,16			

Glomerulus çapları hakkındaki veriler birlikte değerlendirdiğinde, SLS uygulamasının *P. reticulata* baş böbreğinde glomerulus çaplarını genişletecek biçimde etkili olduğu, ancak etki düzeyinin artan SLS konsantrasyonuna paralel biçimde artmadığı anlaşılmaktadır. (6 mg/L ile 9 mg/L ortalamaları arasında fark mevcuttur)

3.5.4.2 Bowman boşluğu

Baş böbreğinde Bowman boşluğuna ilişkin istatistiksel veriler Çizelge 3.5'de sunulmaktadır. Bu parametre kontrol grubunda ortalama 4,537 µm olarak

ölçülmüştür. Ortalama değerler ilk iki uygulama grubunda kontrole göre artmakta, üçüncü uygulama grubunda düşüş gösterdikten sonra 12mg/L SLS uygulanan son grupta 13,986 µm olarak üst noktaya ulaşmaktadır.

Çizelge 3.6 Bowman boşluklarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer.

BOWMAN BOŞLUĞU		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	51	4,537	2,24	5,88	0,799	0,112	4,312	4,762
	3 mg/L	51	9,576	2,12	40,37	7,240	1,014	7,541	11,614
	6 mg/L	51	16,777	3,56	63,14	12,061	1,689	13,385	20,169
	9 mg/L	51	6,473	3,53	16,75	2,422	0,339	5,792	7,154
	12 mg/L	51	13,986	2,47	58,44	12,267	1,717	10,535	17,436
	Toplam	255	10,270	2,12	63,14	9,525	0,596	9,095	11,445

Histolojik gözlemlerle genel anlamda uyum sağlayan bu değerlerin ilk iki uygulama grubunda artış gösterdikten sonra 9 mg/L uygulama grubunda düşmesi ve son grupta tekrar artması, Çizelge 3.6'da verilen Levene testi sonuçlarında da izlendiği üzere verilerin homojen olmadığını göstermektedir ($p<0.05$).

Çizelge 3.7 Bowman boşluğu verileri için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; <0,05

İstatistik	**df1**	**df2**	**P**
27,434	4	250	0,000

Verilerin normal dağılım gösterip göstermediklerine ilişkin olarak uygulanan iki ayrı test sonucu ise Çizelge 3.7'de sunulmuştur. Shapiro-Wilk testi sonuçları, kontrol grubu ($p>0,05$); dışındaki verilerin normal dağılım göstermediğini ortaya koymuştur ($p<0,05$). Bu durum karşısında, izlenen farklılıkların anlamlı olup olmadığı ayrıca Kruskal Wallis testi ile değerlendirilmiş (Çizelge 3.8) ve anlamlı olduğu sonucuna varılmıştır ($p<0,05$).

Çizelge 3.8 Bowman boşluğu verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**P**	İstatistik	**P**
GRUPLAR	**Kontrol**	51	0,112	**0,147**	0,966	**0,146**
	3 mg/L	51	0,289	**0,000**	0,662	**0,000**
	6 mg/L	51	0,168	**0,001**	0,824	**0,000**
	9 mg/L	51	0,167	**0,001**	0,817	**0,000**
	12 mg/L	51	0,213	**0,000**	0,803	**0,000**

Çizelge 3.9 Bowman boşluğu verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	50,09	4	104,132	0,000
3 mg/L	143,67			
6 mg/L	189,64			
9 mg/L	106,03			
12 mg/L	150,58			

Bowman boşluğu hakkındaki veriler birlikte değerlendirdiğinde, glomerulus çap verilerine kıyasla SLS uygulamasının baş böbreğinde bowman boşluğunu daha belirgin ve genişletecek biçimde etkili olduğu, ancak etki düzeyinin artan SLS konsantrasyonuna paralel biçimde artmadığı anlaşılmaktadır.

3.5.4.3 İnterrenal hücre ve nukleus çapları

İnterrenal hücre çap ölçümleri ile istatistiksel analiz değerleri Çizelge 3.9'da sunulmuştur. Buna göre hücre çapları kontrol grubunda ortalama 8,842 µm olarak ölçülmüştür; 3 ve 9 mg/L uygulaması sonucunda elde edilen değerler daha yüksek olmak kaydıyla tüm uygulama gruplarında interrenal hücre çapları kontrollerden daha büyüktür.

Veriler, Levene test sonuçlarına göre (Çizelge 3.10) homojenite göstermemektedir ($p<0,005$). Çizelge 3.11'da Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre dağılım normal değildir ($p<0,05$). Kruskal-Wallis analizi (Çizelge 3.12) kontrol grubu ile deneme grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermiştir ($p< 0,05$).

Çizelge 3.10 İnterrenal hücre çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer.

İNTERRENAL HÜCRE ÇAPI		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	50	8,842	6,33	11,48	1,342	0,237	8,358	9,326
	3 mg/L	50	10,774	5,70	18,86	2,855	0,504	9,745	11,803
	6 mg/L	50	9,856	6,33	12,51	1,535	0,271	9,303	10,409
	9 mg/L	50	10,506	8,16	12,98	1,135	0,201	10,097	10,915
	12 mg/L	50	9,102	3,72	11,91	1,572	0,278	8,536	9,669
	Toplam	250	9,816	3,72	18,86	1,925	0,152	9,516	10,117

Çizelge 3.11 İnterrenal hücre çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; $P<0,05$.

İstatistik	**df1**	**df2**	**p**
5,430	4	155	0,000

Çizelge 3.12 İnterenal hücre çap verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**P**	İstatistik	**P**
GRUPLAR	**Kontrol**	50	0,074	**0,200***	0,980	**0,800**
	3 mg/L	50	0,198	**0,003**	0,891	**0,004**
	6 mg/L	50	0,088	**0,200***	0,976	**0,682**
	9 mg/L	50	0,073	**0,200***	0,989	**0,980**
	12 mg/L	50	0,157	**0,042**	0,921	**0,022**

Çizelge 3.13 İnterenal hücre çap verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; <0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	54,50	4	26,988	0,000
3 mg/L	93,78			
6 mg/L	85,53			
9 mg/L	105,59			
12 mg/L	63,09			

İnterrenal hücrelerde nukleus çap ölçümleri ile istatistiksel analiz değerleri ise Çizelge 3.13'de görülmekte olup nukleus çapları tüm gruplarda birbirine yakın değerlerdedir. Verilerin homojen olduğu Çizelge 3.14'de verilen Levene test sonuçlarıyla ortaya konmuştur (p>0,005).

Çizelge 3.14 İnterrenal hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer.

İNTERRENAL HÜCRE NUKLEUS ÇAPI		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	50	3,857	2,77	4,46	0,364	0,064	3,726	3,988
	3 mg/L	50	4,151	3,08	6,53	0,644	0,114	3,919	4,383
	6 mg/L	50	4,024	3,25	5,05	0,429	0,076	3,869	4,179
	9 mg/L	50	4,302	3,86	5,46	0,254	0,045	4,209	4,393
	12 mg/L	50	4,139	3,39	8,24	0,811	0,144	3,846	4,431
	Toplam	250	4,095	2,77	8,24	0,553	0,044	4,008	4,181

Çizelge 3.15 İnterrenal hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

İstatistik	**df1**	**df2**	**p**
1,575	4	155	0,184

Veri dağılımının normal olup olmadığına dair (Çizelge 3.15) Shapiro-Wilk testi sonuçlarına göre veriler normal dağılım göstermemektedir (p<0,05).

Çizelge 3.16 İnterrenal hücrelerde nukleus çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**p**	İstatistik	**p**
GRUPLAR	**Kontrol**	50	0,083	**0,200***	0,961	**0,285**
	3 mg/L	50	0,206	**0,001**	0,838	**0,000**
	6 mg/L	50	0,208	**0,001**	0,875	**0,001**
	9 mg/L	50	0,106	**0,200***	0,961	**0,297**
	12 mg/L	50	0,304	**0,000**	0,534	**0,000**

Nukleus çaplarına ilişkin verilerin, homojenite gösterirken normal dağılım göstermemesinin örneklem sayısıyla bağlantılı olabileceğinde hareketle; kontrol

ve deneme grupları arasında izlenen farkların anlamlı olup olmadığı ayrıca Kruskal Wallis testi ile analiz edilmiştir (Çizelge 3.16). Buna göre kontrol grubu ile deneme grupları arasında anlamlı bir fark bulunmaktadır ($p< 0,05$).

Çizelge 3.17 İnterrenal hücrelerde nukleus çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	57,52	4	26,044	0,000
3 mg/L	79,19			
6 mg/L	72,20			
9 mg/L	114,36			
12 mg/L	79,23			

3.5.4.4 Kromaffin hücre ve nukleus çapları

Çizelge 3.17'de kromaffin hücre çaplarına ilişkin veriler yer almaktadır. Kontrol grubundaki ortalama çapları 11,136 μm olarak ölçülmüştür. Çapların özellikle 9 mg/L SLS uygulamasıyla büyüdüğü ve bu durumun 12 mg/L uygulama grubunda da sürdüğü dikkat çekmektedir.

Levene testi sonuçlarına göre (Çizelge 3.18) veriler hetereojendir ($p<0,05$); dağılım analizleriyle de (Çizelge 3.19) normal dağılım göstermedikleri izlenmiştir ($p<0,05$). Kruskal-Wallis analizleri (Çizelge 3.20) kromaffin hücre çapı verilerinde kontrol grubu ile deneme grupları arasında anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir ($p<0,05$). Bu sonuçlar, göre 9 ve 12 mg/L deneme gruplarında hücrelerin büyüdüğü yönündeki görüşü istatistiksel olarak desteklemektedir.

Çizelge 3.18 Kromaffin hücre çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer

KROMAFFİN HÜCRE ÇAPI		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	50	11,136	8,79	13,51	1,228	0,217	10,693	11,579
	3 mg/L	50	13,270	10,26	19,90	1,843	0,325	12,605	13,935
	6 mg/L	50	11,697	7,64	17,09	2,861	0,505	10,665	12,728
	9 mg/L	50	15,172	13,05	18,60	1,420	0,251	14,659	15,684
	12 mg/L	50	15,207	12,94	17,82	1,149	0,203	14,792	15,621
	Toplam	250	13,297	7,64	19,90	2,469	0,195	12,910	13,682

Çizelge 3.19 Kromaffin hücre çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

İstatistik	**df1**	**df2**	**p**
11,493	4	155	0,000

Çizelge 3.20 Kromaffin hücre çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**p**	İstatistik	**p**
GRUPLAR	**Kontrol**	50	0,088	0,200*	0,975	**0,632**
	3 mg/L	50	0,158	0,041	0,875	**0,002**
	6 mg/L	50	0,163	0,031	0,894	**0,004**
	9 mg/L	50	0,133	0,162	0,952	**0,163**
	12 mg/L	50	0,159	0,038	0,953	**0,180**

Çizelge 3.21 Kromaffin hücre çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	37,92	4	79,781	0,000
3 mg/L	76,52			
6 mg/L	52,81			
9 mg/L	117,58			
12 mg/L	117,67			

Kromaffin hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin veriler Çizelge 3.21'de sergilenmiştir. Nukleus çapları kontrol ve deneme gruplarına birbirine oldukça yakın değerlerde olmasına rağmen Levene testi ile (Çizelge 3.22) verilerin yine homojen olmadığı ($p<0,05$); dağılımlarının da (Çizelge 3.23) normal olmadığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Bu heterojen ve normal olmayan dağılıma rağmen, Kruskal-Wallis analizleri (Çizelge 3.24) kromaffin hücrelerin nukleus çaplarında kontrol grubu ile deneme grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymaktadır ($p>0,05$).

Çizelge 3.22 Kromaffin hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin istatistiksel veriler. N, örneklem sayısı; Min., minimum; Maks., maksimum değer.

KROMAFFİN HÜCRE NUKLEUS ÇAPI		N	Ortalama (µm)	Min. (µm)	Maks. (µm)	Standart Sapma	Standart Hata	% 95 Güven Aralığı	
								Alt Sınır	Üst Sınır
GRUPLAR	**Kontrol**	50	4,542	3,42	5,33	0,413	0,073	4,393	4,691
	3 mg/L	50	4,608	3,57	5,27	0,358	0,063	4,479	4,738
	6 mg/L	50	4,785	3,77	6,87	0,663	0,117	4,546	5,024
	9 mg/L	50	4,813	4,24	5,85	0,345	0,061	4,688	4,938
	12 mg/L	50	4,864	4,23	5,50	0,275	0,048	4,765	4,963
	Toplam	250	4,722	3,42	6,87	0,444	0,035	4,653	4,792

Çizelge 3.23 Kromaffin hücrelerde nukleus çaplarına ilişkin veriler için Levene homojenite testi. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

İstatistik	**df1**	**df2**	**p**
7,957	4	155	0,000

Çizelge 3.24 Kromaffin hücrelerde nukleus çapı verileri için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk dağılım analizleri. Df., serbestlik derecesi; P, önem derecesi; P<0,05.

ANALİZ		df	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
			İstatistik	**P**	İstatistik	**P**
GRUPLAR	**Kontrol**	32	0,099	**0,200***	0,950	**0,142**
	3 mg/L	32	0,082	**0,200***	0,965	**0,374**
	6 mg/L	32	0,110	**0,200***	0,928	**0,034**
	9 mg/L	32	0,183	**0,008**	0,914	**0,014**
	12 mg/L	32	0,057	**0,200***	0,994	**1,000**

Çizelge 3.25 Kromaffin hücrelerde nukleus çapı verileri için Kruskal Wallis testi sonuçları. N; örneklem sayısı, df; serbestlik derecesi; P; önem derecesi; P<0,05.

GRUPLAR	Sıra Ortalaması	df	Ki-kare	p
Kontrol	63,28	4	13,694	0,008
3 mg/L	67,20			
6 mg/L	83,69			
9 mg/L	88,61			
12 mg/L	99,72			

İstatistiksel veriler hakkında yapılan bütünsel değerlendirme, histolojik gözlemleri destekler nitelikte oldukları yönündedir. Buna göre SLS uygulaması glomerulus çaplarında artışa yol açmakta; fakat bu artış artan SLS konsantrasyonlarına paralellik göstermemektedir. SLS uygulamaları baş böbreğinin endokrin elemanlarından interrenal hücrelerde daha hafif, kromaffin hücrelerde ise belirgin hiperplazi oluşturmaktadır. Her iki hücrede de çapların 9mg/L SLS uygulamasında belirgin olarak arttığı ve artışın en yüksek konsantrasyonda sürdüğü izlenmiştir. İnterrenal hücre nukleuslarının çapı kontrollere göre anlamlı biçimde büyürken kromaffin hücrelerde böyle bir durum söz konusu değildir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

4.1 Genel Değerlendirme

Çağdaş dünyada tüm üretim-tüketim dengeleri sürekli artan nüfusun baskısı altındadır ve yazık ki her zaman doğal çevre aleyhine değişmektedir. Bireylerden devletlere ve uluslararası topluluklara kadar her düzeydeki konformist yaklaşım uzantısında tarım, kentleşme, sanayi ve teknolojiyi büyük bir ivmeyle gelişmekte; bu gelişimin bedeli de türlerden populasyonlar, komuniteler ve ekosistemlere kadar hasar gören çevre ve elbette biz insanlar tarafından ödenmektedir. Bu çerçevede bireysel ve toplumsal çevre sorumluluğu taşımanın önemi, günlük yaşamda zararları pek düşünülmeden kullanılan birçok madde gibi deterjanlar ile etken maddeleri konusunda da karşımıza çıkar.

Sürfaktanlar; en sert sularda bile temizleme özelliği taşıyan ucuz kimyasallar olarak hayatımıza girdikleri 1950'li yıllardan beri sadece temizleme işlemlerinde değil kişisel bakım ürünlerinde, bazı ilaç ve pestisit formülasyonlarında ve birçok üretim sürecinde giderek artan miktarlarda kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler üretim ve tüketimleri sırasında doğrudan doğruya kanalizasyonlar yoluyla ya da denetimsiz elden çıkarmalar sonucunda sürekli olarak karıştıkları çevre fazlarındaki en ciddi etkiyi sucul ekosistemlerde gösterirler. Evsel ve endüstriyel atık sistemlerinde kurulacak özel arıtım düzenekleri çevreye karışmalarını belli ölçüde engelleyebilir. Ancak bu düzeneklerin birçok kentte ve sanayi bölgesinde bulunmadığı; üstelik bütün diğer kimyasallar gibi sürfaktanların da sucul ekosistemlere sadece doğrudan yollarla değil toprak, sediment gibi diğer çevre fazları üzerinden, dolaylı olarak da gireceği ve nasıl girerse girsin; çevresel parçalanma ve birleşme işlemleriyle farklı ve yeni kimyasallara dönüşebileceği unutulmamalıdır.

Sadece genel bilgilerle, yani dar kapsamlı bir yaklaşım gösterildiğinde; yüksek biyoçözünürlük nitelikleriyle sürfaktanların çevre için çok fazla zararlı olmayacağı, bir diğer deyişle yol açtıkları çevresel tahribatın kabul edilebilir düzeyde olduğu düşünülebilir. Oysa ayrıntılı bilgiler bu düşünceyi doğrulamaz, çünkü bu maddeler çevreye sürekli olarak ve çok yüksek miktarlarda karışmakta, böylece çevresel konsantrasyonları giderek artmaktadır. Bu artış sürfaktan-çevre

ilişkisinde çok fazla önemsenmeyen CMC değerlerinin yükselmesine neden olur ve "yüksek biyoçözünürlük" kavramını anlamsızlaştırır.

Bir diğer ifade biçimiyle, sürfaktanların çevre üzerindeki olumsuz etkileri düşünüldüğünden çok daha önemli olabilir. Sunulan tez çalışmasında materyal seçiminden yönteme, buradan sonuçlara kadar bütün değerlendirmeler bu ana eksen üzerinden yapılmıştır.

Sodyum lauryl sülfat en yaygın kullanılan sürfaktanlardan biridir ve günümüzde daha çok şampuan ve diş macunu gibi kişisel bakım ürünlerinde yer almaktadır. Kısaca hepimizin evinde bulunan bir madde olduğu rahatça söylenebilir, materyal seçiminde bu husus özellikle dikkate alınmıştır. Çok popüler bir akvaryum balığı olan *P. reticulata* ise ekotoksikolojik araştırmalarda model olmaya çok uygun nitelikleriyle tercih edilmiş, deneysel koşullara gösterdiği yüksek uyum ve kirli sulara gösterdiği dayanıklılık da bu seçimi desteklemiştir. Kontrol ve deneme gruplarında hiçbir ölüm olgusu gözlenmemesi seçimin yerinde olduğunu göstermektedir.

Baş böbreği karmaşık organizasyonu ve işlevleriyle farklı yöntemler kullanılarak incelenmesi gereken özel bir yapıdır. *P. reticulata*'nın baş böbreği üzerinde ulaşılabilen kaynaklarda deterjan ve/veya sürfaktanların bu yapı üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir rapora rastlanmamış olması, veri tabanlarının genişletilmesi hedefiyle önemli bir motivasyon kaynağı olmuştur.

Yöntem seçiminde gösterilen klasik yaklaşım, son yıllarda moleküler biyolojik yöntemlerin çok daha geçerli oldukları öne sürülerek eleştirilebilir; hatta bu eleştiri hücre ve doku kültürü yöntemlerinin giderek yaygınlaşan kullanımları öne sürülerek güçlendirilebilir. Ancak bu gerçekler histopatolojik yöntemlerin önemini kesinlikle azaltmaz. Çünkü bu yöntemler halâ pratik, ucuz ve hızlıdır, üstelik güvenilirlikleri ciddi ölçüde yüksektir. Bu özellikleriyle, kimyasalların etkilerinin vücut bütünlüğü içerisinde değerlendirilmesini sağlayan temel verileri sunarak daha gelişmiş yöntemlerin kullanılacağı araştırmalara rehberlik ederler. Sunulan araştırmada bu noktadan hareketle kullanılan histopatolojik yöntemler ayrıca istatistiksel yöntemlerle desteklenmiştir.

Tüm sonuçlar aşağıda ayrı alt başlıklarda ayrıntıyla değerlendirilmektedir.

4.2 Kontrol Grubunda Histolojik Yapı

4.2.1 Baş böbreği-Kaudal böbrek ayrımı, renal korpüskül ve tübüller

Mevcut araştırmalarda, farklı ve ilginç görevleri ile karmaşık bir organ olan baş böbreği işlevlerinin genellikle ayrı ayrı değerlendirilmesi yoluna gidilmiş; baş böbreği ile kaudal böbreğin yapısal ve fonksiyonel farklılıkları üzerinde çok fazla durulmamıştır (Zwollo et al., 2005). Çok sayıda türü kapsayan Teleostei grubunda baş böbreğinin anatomik yerleşimi ve şekli, giriş bölümünde de belirtildiği üzere büyük çeşitlilik gösterir. Ordo, familya ve hatta tür düzeyinde gözlenen bu çeşitlilik baş böbreği-kaudal böbrek ayrımının net olarak yapılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu zorluk, Gallo and Civinini (2003) tarafından yapılan modellemede endokrin işleve sahip hücrelerin yerleşimi esas alınarak bir ölçüde aşılmıştır. Cypriodontiformes üyesi olan *P. reticulata'*da endokrin dokunun yerleşimi bu modellemedeki *Gambusia* türüne benzer biçimdedir. Modellemenin özetlendiği Şekil 1.2'de izlendiği üzere örneğin Siluriformes üyeleri *Plotosus anguillaris* ve *Parasilurus asotus'*da kaudal böbrekten tamamen ayrıdır. Anguilliformes üyesi *Anguilla japonica ve* Perciformes üyesi *Niphon spinosus* türlerinde ise kaudal böbreğin sırasıyla daralan ve genişleyen uzantısı olarak gözlenir. Cyprinodontiformes üyelerinden *Misgurnus anguillicaudatus'*da kaudal böbreğin ince bir uzantısı halindeyken *Cyprinus carpio*'da kaudal böbreğin genişlemiş ön kısmında yer alır; *D. rerio*'da ise ön kısımda birleşmiş bilateral loplardan oluşur (Hsu et al., 2001).

Yerleşimi ve organizasyonu böylesi farklılıklar gösteren baş böbreğinde farklı lenfositlerin üretiminde gözlenen bölgesel farklılık, baş böbreği-kaudal böbrek ayrımının önemini bir kez daha vurgulamaktadır (Zwollo et al., 2005, 2011). Lenfosit oluşum ve olgunlaşma aşamalarının daha gelişmiş teknikler kullanılarak değerlendirileceği çalışmalar bu ayrımın daha kesin biçimde ortaya koyabilir. Sunulan tezdeki histolojik incelemelere dayanılarak ve özellikle

endokrin işlevi esas alınarak, *P. reticulata*'da baş böbreğinin, tüm böbreğin yaklaşık ¼'ünü oluşturduğu kanısına varılmıştır. Bu oran Perciformes üyesi olan *Dicentrarchus labrax* (Meseguer, et al., 1991; Esteban and Meseguer, 1994) ile Asya, Doğu Afrika ve Amerika'da örneklenen birçok Cichlid türünde (Fishelson, 1996) 1/3 olarak verilmiştir. Aradaki farklılık *P. reticulata* örneklerinin söz edilen diğer türlere göre daha küçük olmasından kaynaklanabilir.

Ontolojik gelişim sürecinde pronerfroz böbreğin ve mezonefroz böbrek önünde yer alan tübüllerin dejenerasyonu ile oluşan baş böbreğinin gövde böbreği ile birleşik bulunması, renal işlevleri olabileceği yönündeki düşüncenin çıkış noktasıdır ve organın hematopoetik işlevi konusunda uzlaşma varken, renal işlevleri sadece birkaç tane raporda tartışılmıştır (Fishelson, 1996; Hoole, 2001; Fishelson, 2006).

Tilapinae ve Haplochrominae familyalarına dahil altışar türde baş böbreğinin ontogenetik gelişimini inceleyen Fishelson (1996), bu türlerin erginleri için renal işlevi kesin ifadelerle reddetmektedir. Araştırmacıya göre gelişim başlangıcı ile larval-postlarval dönemde renal işlevleri de bulunan baş böbreği, jüvenil aşamasından başlayarak bu işlevlerini yitirerek sadece hematopoetik organ olarak görev yapmaktadır; dolayısıyla bu yapıda işlevsel nefron gözlediklerini kaydedenler bölgesel anlamda hataya düşmektedirler. Hoole et al. (2001) tarafından da, baş böbreğinide yitirilen renal işlevlerin yerini immün işlevlerin aldığı bildirilmiştir.

Fishelson (2006), renal işleve dair düşüncesini sonradan Apogonidae familyası için değiştirmiştir Buna göre farklı *Apogon* türlerinin baş böbreğinde primer renal tübüller bulunmakta, ancak nefron yapısından söz edilmemektedir. Diğer bazı türlerde de baş böbreğinde nefron bulunduğuna dair bilgi yoktur. Örneğin Mela et al. (2007), *Hoplias malabaricus'*da yaptıkları ince yapı araştırmasında hiçbir şekilde nefronlardan ve renal işlevlerden söz etmezler. Salazar-Lugo et al. (2013) ise *Colossoma macropomum'*da baş böbreği parenkiminde hiç nefron gözlenmediğini bildirerek bu organın temel işlevini hematopoezis ile sınırlarlar.

Diğer türlerde olduğu gibi *P. reticulata*'da da anterior-posterior böbrek ayrımı net sınırlarla çizilemezse de; baş böbreği olarak değerlendirilen kısmın tamamında renal korpüskül ve tübüllerin gözlenmesi yukarıdaki bulgu ve yorumlara paralel değildir. Bu durum baş böbreğinin büyük olasılıkla renal işlevleri de sürdürdüğünü düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda izlenen renal korpüsküller birbirlerinden uzak halde konumlanmıştır ve sayıları da gövde böbreğinde yan yana yerleşmiş halde izlenen glomeruluslara göre çok daha azdır. Korpüskül ve tübüllerde renal işlevlerinin sınırlı olduğu şeklinde yorumlanabilecek bu yerleşim ve sayı farkı dışında, en azından histolojik olarak işlevsizliğe işaret eden bir durum gözlenmemiştir. Fakat çalışma materyalimizde baş böbreğinin ontogenetik gelişimi izlenmeden ve renal işlevleri tam olarak ortaya koyabilecek daha ayrıntılı araştırmalar yapılmadan bu konuda net bir sonuca varılamaz. Bu nedenle özellikle tartışma kısmında " olası" renal işlevler deyimi kullanılmıştır.

4.2.2 Hematopoetik doku ve işlevler

Baş böbreğinin üzerinde tümüyle uzlaşılmış olan görevi kan hücreleri yapımıdır. Giriş bölümünde de belirtildiği üzere yetişkin teleostlarda başta eritropoezis olmak üzere hematopoesiz; dalak, baş böbreği ve mezonefroz böbrekte gerçekleşir (Esteban et al., 1989; Meseguer et al., 1990; Romano et al., 1998; Esteban et al., 2000; Fishelson, 2006; Kondera, 2011). Bu organların görevleri bazı türlerde eşit dağılırken diğer bazılarında farklı ağırlıklardadır (Homechaudhuri, 2001). Kondera (2011), önceki çalışmalara atfen *Salmo trutta*'da sadece dalağın, *Rutilus rutilus*'da sadece böbreğin, *Perca fluviatilis*'de ise her iki organın da aktif olduğunu bildirmektedir.

Kan hücreleri balıklarda da çevresel stres göstergesi olarak büyük önem taşır; ancak çok büyük dönüşüm kapasitesi ile strese çok duyarlı olacağı düşünülen hematopoetik dokuda çevresel etkilerle oluşabilecek hasarlara ilişkin veriler sınırlıdır (Kondera, 2011; Kondera and Witeska, 2013). Hematopoezisin farklı serilerindeki hücre tanımları konusunda uzlaşma olmadığına önemle dikkat çeken Kondera (2011) tarafından hematopoezis sürecindeki hücrelerin tanımlamalarına dair kapsamlı bir çalışma yapılmıştır. Sunulan tezde de bu

çalışma esas alınmış, ancak ışık mikroskobunda tanımlanamayan hücrelerin varlığına rağmen trombopoesiz aşamaları net biçimde belirlenememiştir. Trombopoesizin lenfopoezisle karıştırılma olasılığının yüksek olduğunu ve yayma preparasyonda küçük hücrelerin daha çok zarar gördüğünü de bu noktada önemle kaydetmek gerekir. Bu çerçevede ayırt edilebilen hematopoetik süreçlere dair karşılaştırmalar ayrı alt başlıklarda verilmektedir:

***Eritropoezis*:** Bu süreç farklı gelişim aşamalarındaki hücrelerin şekil farklılıkları, boyanmaları, nukleus büyüklükleri ve kromatin yoğunlukları dikkate alınarak belirlenir. Buna göre gelişim sürecinde dereceli olarak bazofilikten eozinofiliğe dönen sitoplazma rengi; düzensizken sırayla yuvarlak, oval ve elipsoide dönen hücre şekli; polikromatik eritroblast aşamasına doğru dereceli olarak azalıp sonra tekrar artan hücre büyüklüğü ve gelişim başlangıcından sonuna doğru giderek azalan nukleositoplazmik oran karakteristiktir (Qian et al., 2007; Carradice and Lieschke, 2008; Abdel-Aziz et al., 2010b).

Eritrosit gelişim aşamalarının tanımlanmasında bazı terminolojik farklar bulunduğundan daha önce de söz edilmişti. Örneğin *Ictalurus punctatus*'da eritropoetik süreç proeritroblast→bazofilik eritroblast→polikromatik eritroblast→ortokromatik eritroblast→genç eritrosit→eritrosit→iki loplu eritrosit→yaşlı eritrosit serisiyle tanımlanmıştır (Fijan, 2002a). *Clarias batrachus'*da Gangopadhyay and Homechaudhuri (2011) tarafından rapor edilen eritopoetik gelişim sırası ise proeritroblast veya küçük, limfoid eritroblast→bazofilik eritroblast→polikromatofilik eritroblast→asidofilik eritroblast →genç retikülosit→olgun retikülosit→genç eritrosit→olgun eritrosit şeklindedir.

Kondera (2011) *Cyprinus carpio*'da, Abdel-Aziz et al. (2010b) *Oreochromis niloticus*'da, Gangopadhyay and Homechaudhuri (2011) ise *C. batrachus'*da, *I. punctatus*'dan (Fijan, 2002a) farklı olarak ortokromatik eritroblast yerine asidofilik eritroblast tanımını kullanırlar. *C. carpio* için verilen seride ayrıca proeritroblast ile yaşlı eritrosit evreleri yer almaz; *C. batrachus* için kaydedilen seride de genç eritrosit aşamasından önce retikülositler tanımlanmıştır.

Terminolojik farklılıklara rağmen esas gelişim aşamalarının büyük ölçüde benzer olduğunu kaydetmek gerekir. *P. reticulata* için belirlenen eritropoezis aşamaları *I. punctatus* (Fijan, 2002a) ile *C. carpio* (Kondera, 2011) türlerinde tanımlanan histolojik özelliklerle genel anlamda uyumludur. Buna göre eritropoezis süreci proeritroblast→bazofilik eritroblast→polikromatik eritroblast→ortokromik eritroblast→genç eritrosit→eritrosit aşamalarında gerçekleşmektedir.

Bu gelişim süreci *Danio rerio* (Qian et al., 2007; Carradice and Lieschke, 2008) ile *O. niloticus* (Abdel-Aziz et al., 2010b) ve *C. batrachus* (Gangopadhyay and Homechaudhuri, 2011) türlerinde bildirilenlere de büyük ölçüde benzerlik göstermektedir. Sunulan tezde, *I. punctatus* (Fijan, 2002a) için kaydedilen iki loplu eritrositler ve yaşlı eritrositler ile *C. batrachus*'da rapor edilen farklı retikülositler ayırt edilmemiş, ayrıca farklı aşamalardaki hücrelerin yüzdesel değerleri de hesaplanmamıştır. Ancak histolojik gözlemlerimiz, bu serideki hücrelerin hematopoetik dokuda bulunma oranlarının da Fijan (2002a) ve Kondera (2011) tarafından rapor edilenlere benzer olduğunu düşündürmektedir.

***Granülopoezis*:** Bu dizge, diğerlerine oranla tanım karmaşalarının en sık gözlendiği seridir. *D. labrax* (Meseguer et al., 1990) türünde heterofiller, asidofiller ve bazofiller olmak üzere üç granülosit serisi tanımlanırken, *D. rerio*'da genellikle nötrofiller ve eozinofiller/bazofiller olmak üzere iki tip (Carradice and Lieschke, 2008); *O. niloticus*'da ise bazofil, eozinofil ve heterofil (eozinofil) olmak üzere üç granülosit serisi tanımlanır (Abdel-Aziz et al., 2010). *I. punctatus* ve *C. carpio* türlerinde de granülosit serisi nötrofiller, bazofiller ve az sayıdaki eozinofiller olarak gruplanır (Fijan, 2002a; Kondera, 2011). Aynı çalışmada söz edilen ve memelilerdeki nötrofiller ile işlevsel açıdan ortolog olduğu düşünülen heterofilik granülosit tanımı yerine, diğer raporlarda genellikle nötrofil granülosit tanımı kullanılır (Fijan, 2002a,b; Carradice and Lieschke, 2008; Kondera, 2011). Ayrıca memelilerde granülosit serileri nötrofilik, eosinofilik ve bazofilik nitelikleri uzantısında aldıkları ön eklerle miyeloblast--promyelosit—miyelosit—metamyelosit—granülosit şekilde adlandırılır. *O. niloticus* (Abdel-Aziz et al., 2010) ve *D. rerio* (Bennett et al., 2001) türlerinde bu isimlendirme benzerken, *I. punctatus* ve *C. carpio* türlerinde miye- ön eki yerine

granülo- ön eki getirilmiştir (Fijan, 2002a,b). Tanımlardaki bu karmaşa granülositlerin savunma mekanizmalarındaki görevleri konusunda yanlış çıkarımlara da neden olabilir.

Sunulan tezde yine Fijan (2002a) ve Kondera (2011) tarafından verilen detaylar esas alınarak yapılan değerlendirmede, granülopoesizin ilk aşamasını oluşturan miyeloblastlar gözlenememiştir. *P. reticulata'*da granülosit serilerinden nötrofilik ve eosinofilik olmak üzere sadece iki seri ayırt edilebilmiştir.

Nötrofillerin eozinofiller ve bazofiller ile ortak öncül hücrelerden köken almadığı düşünülse de, başta da belirtildiği gibi konuyla ilgili çalışmaların azlığı nedeniyle net bir sonuca varılamaz. Nötrofiller özel boyama yapılmadığında granülsüzmüş gibi gözlenen sitoplazmalarında küçük ve yoğun görünümlü nukleus içeren hücrelerdir (Kobayashia et al., 2006; Kondera, 2011). Birincil granüllerini izleyebilmek için kullanılan ve miyeloperoksidaz (MPO) ile asit fosfataz aktivitesi sağlayan yöntemler nötrofil serisinin daha iyi ayırt edilebilmesine de olanak sağlar (Bennett et al., 2001). Olgunlaşma sürecinde küçülen nötrofillerde kromatin yoğunlaşır ve nukleus önce band şeklinde, sonra iki ya da üç parçalı halde izlenir (Bennett et al., 2001; Lieschke et al., 2001; Fijan, 2002a,b; Scharsack et al., 2003; Abdel-Aziz et al., 2010; Kondera, 2011).

Nötrofilik granül yapısına dair geniş bilgiler veren Flerova ve Balabanova (2013), *Pomatomus saltatrix* ve *Pleuronectes platessa* türlerinde hematopoetik organlarda tek tip granülositin, nötrofillerin bulunduğunu kaydederler. Bu rapora göre nötrofilik granüllerin ince yapıları farklı taksonomik gruplarda farklı şekillerde olabilmektedir. Işık mikroskobu düzeyindeki gözlemlerimizle bu konuda yorum yapılamaz.

*P. reticulata'*da nötrofilik serinin izlenebilen ilk aşaması olan iri progranülositleri nötrofilik progranülositler, nötrofilik metagranülositler, bant nötrofiller ve nötrofiller izlemektedir. Olgunlaşma aşamalarının genel karakteristikleri sitoplazmada boyanma özellikleri değişmeksizin sayıları azalan pembemsi granüller, çok koyu boyanan ve merkezde yerleşmemiş konumdaki nukleusda küçülme ve renginde giderek açılma olarak belirlenmiştir. Bu nitelikler

ulaşılabilen raporlarda belirtilenlerle uyum içerisindedir. *D. rerio* türünde yapılan asidofilik granülosit tanımı (Lieschke et al., 2001), eozinofilik ve nötrofilik granülositlerle karıştırılabileceği için kullanılmamıştır.

Eozinofiller sunulan tezde nötrofillere göre daha sık gözlenmişlerdir. Bu hücrelerin teleost böbreklerindeki görülme yüzdelerine ilişkin kayıtlar farklıdır; örneğin *O. niloticus* türünde baskın granülositler olarak kaydedilmişler (Abdel-Aziz et al., 2010b); ayrıca Wlasow and Dabrowska (1989) tarafından *C. carpio* için verilen %40 değeri Fijan (2002a) tarafından çok daha düşük, %0,20 olarak bildirilmiştir.

*P. reticulata'*da eozinofilik seri eozinofilik progranülositlerle başlayıp metagranülositler, band eozinofiller ve eozinofiller olarak devam etmektedir. Olgun eozinofiller nötrofillerden daha büyüktür. Serinin histolojik özellikleri progranülositlerde çok açık gri renkteki sitoplazmada periferde daha yoğun izlenen bol miktarda, tipik eozinofilik granüller ve merkezde konumlanmamış iri nukleus; metagranülositlerde neredeyse tamamı eozinofilik granüllerle dolu sitoplazma ve yine merkezde konumlanmayan, bazen çentikli gözlenebilen; band eozinofillerde ise belirgin biçimde uzamış ve loplara bölünmüş nukleus olarak belirlenmiştir. Bu özellikler *I. punctatus* ve *C. carpio* (Fijan, 2002a; Kondera, 2011) türlerinde bildirilenlere uygunluk göstermektedir.

Ulaşılabilen kaynaklarda bu hücrelerin işlevlerini belirleyebilecek bir moleküler belirteç kaydedilmemiştir. Ayrıca ve önemle, dolaşım kanında ve/veya böbrekte eozinofil öncüllerinin varlığına dair kayıt da bulunmamaktadır (Lieschke et al., 2001; Berman et al., 2005; Travares-Dias, 2006). *Misgurnus anguillicaudatus* türünde eozinofillerin özellikle dalakta ve çok az miktarda da böbrekte farklılaştığı bildirilmektedir (Ishizeki et al., 1984).

Yukarıda belirtildiği üzere sadece nötrofilik ve eozinofilik seri ayırt edildiği *P. reticulata*'da bazofiller ve bazofil serisine ait herhangi bir gelişim aşaması izlenememiştir. Bu hücrelerin, nötrofillerin aksine MPO ve asit fosfataz ile boyanmazken PAS boyama yöntemiyle ayırt edilebilecekleri; insan kemik iliğinde bazofilik serileri gözleyebilmek için gayet iyi sonuçlar veren Sudan Black B,

monositik esteraz, klorasetat esteraz ve toluidin blue gibi boyamaların teleostlarda ayırt edici nitelik taşımadığı bildirilmiştir (Bennett et al., 2001). Bazofillerin genel anlamda teleost hematopoetik dokularındaki bulunuş oranları yaklaşık %1 olarak çok düşüktür (Fijan, 2002a; Kondera, 2011). Ancak çelişik bulgular da yok değildir, örneğin *D. rerio* böbreğinde memeli kemik iliğindekine benzer şekilde olgun bazofil ve eozinofil formlarının daha çok gözlendiği de bildirilmiştir (Bennett et al., 2001). Bu noktada, çalışılan birçok balık türünde bazofilik serinin ayırt edilemediğini eklemek gerekir. Flerova and Balabonova (2013) tarafından yapılan ve Salmoniformes, Cypriniformes ve Perciformes ordolarına mensup çok sayıda türü kapsayan geniş çaplı araştırmada, mevcut kayıtlara göre sadece iki türde, *C. carpio* (Cypriniformes) *ve D. labrax'*da (Perciformes) bazofillerin gözlenebildiğini bildirmektedirler.

Çok fazla sayıdaki türle çok büyük bir çeşitlilik gösteren teleostlarda hematopoetik sürecin türlere göre değişmesi beklenebilir bir durumdur ve bazofillerde izlenen farklılıkların evrimsel süreçte gerçekleşen bazı adaptasyon mekanizmalarıyla açıklanabileceği öne sürülmüştür (Travares-Dias, 2006).

Granülopoezis sürecinin farklı teleost türlerinde araştırılması gerektiği açıktır. Farklı türler kullanılarak yapılacak daha ayrıntılı araştırmalar, granüllü lökositlerin bakteri ve/veya virüs kaynaklı enfeksiyonlara karşı savaşta nasıl evrimleşmiş olduklarını da ortaya koyabilir (Lieschke et al., 2001; Berman et al., 2005; Travares-Dias, 2006).

***Agranülopoezis*:** Lenfosit ve monositlerin gelişim sürecidir.

Lenfositler türlere göre değişmekle birlikte; PAS, peroksidaz, alkalin fosfataz ve spesifik olmayan esteraz gibi histokimyasal boyamalarla ayırt edilemeyen hücrelerdir (Bennett et al., 2001; Fijan, 2002a; Travares-Dias, 2006). Baş böbreğinde bulunma oranları %12-65 arasında olmak kaydıyla sadece farklı türlerde değil, aynı tür için bile farklılık göstermekte ve bu durum değişik yorumlara yol açmaktadır (Wlasow ve Dabrowska 1989; Fijan, 1961, 2002 a, b; Kondera, 2011, 2014). Wlasow ve Dabrowska (1989) tarafından *C. carpio* baş böbreğinde bildirilen bulunma oranları %13,69 olarak oldukça düşüktür. Buna

karşın *I. punctatus'*da verilen %41.3 değeri ile (Fijan, 2002b) *C. carpio* için verilen %39 değeri birbirine yakındır (Kondera, 2011). Bu gibi farklılıkların hematopoetik serilerin ayırt edilme ve isimlendirilmesindeki uyumsuzluklardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Fijan, 2002a,b). Terminolojideki farklılığın altında yatan tanımlama güçlükleri düşünüldüğünde bu görüşe katılmamak mümkün değildir.

Sunulan tezin bulguları mevcut bilgilerle örtüşmektedir, lenfositler yüzde verilememekle birlikte *P. reticulata*'da en sık izlenen hücrelerdir. Serinin lenfoblastları, koyu mor renkli ve şekilsiz nukleusları sitoplazmayı neredeyse tamamen kaplamış olan küçük hücrelerdir. Prolenfoid hücrelerde rengi çok az açılan nukleus oval-yuvarlak şekilli ve merkezi konumludur; mavimsi boyanan, homojen görünümlü sitoplazmada yine çok büyük yer tutmaktadır. Proplazmosit ve plazmositlerde nukleus çok küçülmekte ve sitoplazmada bazen vakuoller izlenmektedir. Serinin karakteristik özellikleri sitoplazmanın boyanma özelliği değişmezken oldukça küçülen nukleus renginde açılmanın sürmesi olarak, esas alınan raporlarda kaydedilenlere uygundur (Fijan, 2002a; Kondera, 2011).

Lenfosit alt populasyonlarının belirlenmesi amacıyla moleküler belirteçlerin kullanıldığı çeşitli araştırmalar yapılmıştır. B hücreleri gelişimine özgü transkripsiyon faktörlerinin gen ifadelerine dair raporlar vardır (Hansen and Kaatari, 1995; Stenvika et al., 2001; Ellis, 2001; Huttenhuisa et al., 2005; Zwollo et al., 2005; Hunt and Rice, 2008; Zwollo, 2011; Filatreau et al., 2013; Covello et al., 2013). Plazma hücrelerinin ürettiği IgM moleküllerine özgü transkripsiyon faktörlerinin gen ifadeleri ile yapılan çalışmalar da, B lenfositlerinin baş böbreğinde üretildiğini desteklemektedir (Zwollo et al., 2005; Hunt and Rice, 2008; Zwollo, 2011; Filatreau et al., 2013; Covello et al., 2013). Monoklonal antibadiler kullanılarak yapılan araştırmalara göre (Scapigliati et al., 1999; Santos et al., 2000; Tokuda et al., 2000; Chistiakov et al., 2007; Sunyer, 2012) IgM molekülleri gelişim aşamalarında ilk kez baş böbreğinde belirlenirler ve bu organda türlere göre değişse de en fazla miktarda bulunurlar. Sunulan çalışmada baş böbreğinin embriyonik gelişimi incelenmemiş; herhangi bir immünohistokimyasal yöntem de kullanılmamıştır, bu nedenle embriyolojik gelişimine ve immünoglobulinlere ilişkin yorum da getirilemez.

Monosit farklılaşma süreçlerinin kök hücreleri olan monoblastlar, hematopoetik dokudaki diğer tüm hücrelerden daha büyüktür. Baş böbreğinde bulunma oranları %0,95-1 arasında değişen monositoidler sırasıyla promonosit ve monositlere dönüşürler (Fijan, 2002a; Kondera, 2011). Promonositlerde nukleus, mavi tonlarında boyanan sitoplazmanın yarıdan fazlasını nukleus işgal eder. Farklı büyüklüklerdeki monositler düzensiz, genelde böbrek ve bazen de at nalı şeklindeki (Travares-Dias, 2006) nukleuslarıyla karakterize edilirler. Sitoplazmada vakuoller de gözlenebilir (Peters and Schwarzer, 1985; Zuasti and Ferrer, 1989; Abdel-Aziz et al., 2010; Kondera, 2011).

P. reticulata'da literatür bilgisine paralel olarak monoblastların açık mavi tonlarda boyanan heterojen sitoplazmalarında vakuoller görülebilir, merkezde yerleşmeyen iri nukleus eozinofilik yapıda ve düzensiz oval şekillidir. Promonositlerde nukleus küçülmeye başlar, olgun monositlerde ise hem koyu bazofilik ve yuvarlak nukleus, hem de hücre başlangıca göre çok daha küçüktür. Bağ dokusuna geçen monositler iri nukleusları ile tipik makrofaj nitelikleri gösterirler, bazen içlerinde fagosite ettikleri diğer hücrelerin nukleus parçacıkları izlenebilir.

Trombositler baş böbreği ve dalakta farklılaşıp olgunlaşırlar. Işık mikroskobu ile yapılan çalışmalarda lenfositlere benzediklerine (Fijan, 2002a.b; Kondera, 2011) ve serideki farklı hücrelerin ancak elektron mikroskobu ile tanımlanabileceğine daha önce de değinilmişti (Esteban, et al., 1989; Zuasti and Ferrer, 1989; Carradice and Lieschke, 2008; Abdel-Aziz et al., 2010b). Baş böbreğinde olgun trombositlerin oranı ortalama %20 olarak kaydedilmiş, ancak öncülleri gözlenememiştir (Fijan, 2002b; Kondera, 2011; 2012). Bu çalışmada da trombositler ve öncülleri olan hücreler tesbit edilememiştir.

4.2.3 İmmün işlevler: lenfoid doku ve melanomakrofaj merkezleri

Baş böbreğinin son yıllarda büyük oranda netlik kazanan hematopoetik işlevleriyle kemik iliğine analog ve özellikle deniz balıklarında birincil lenfoid

organ olduğu savunulmaktadır (Salinas et al., 2011; Zwollo, 2011; Kum ve Sekkin, 2011).

Lenfoid dokularda geniş sinüzoidler çevresindeki parenkimayı destekleyen retiküler stromada yer alan hareketli ve hareketsiz hücre populasyonları T ve B lenfositler, monositler, granülositler (özellikle nötrofiller), trombositler, mast hücreleri, sitotoksik hücreler ve makrofajlar; teleostlarda da özgül ve özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinden sorumludur (Romano et al., 1997; Press and Evensen, 1999; Zwollo et al., 2005).

Stromanın fagositik hücreleri hem görev süreleri sınırlı ve/veya hasar görmüş hücrelerin ve diğer atıkların ortadan kaldırılmasında, hem de örneğin mikrobiyal ve mikrosporadiyal enfeksiyonlara karşı gösterilen yani özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinde görev yapar (Romano et al., 1998; Froystad et al., 1998; Magnadottir, 2006: Hall et al., 2007; Chistiakov et al., 2007; Bowden, 2008; Rodríguez et al., 2008; Raida and Buchmann, 2008; Raida and Buchmann, 2009; Mohanty and Sahoo, 2010; Reyes-Becerril et al., 2011). Özgül olmayan bağışıklıkta temel görevleri antijen sunarak humoral tepkileri tetiklemek, böylece sitokinlerin de devreye girmesini sağlamaktır (Ellis, 2001; Holland and Lambris, 2002; Tort et al., 2003; Hall et al., 2007; Kum ve Sekkin, 2011; Uribe et al., 2011; Muiswinkel and Nakao, 2014). Bu süreçler sonunda vücuttan uzaklaştırılması gereken materyal renal portal sisteme aktarılır (Romano, et al., 1998; Zwollo, 2011; Forrester et al., 2012).

Yüksek omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinde görevli başlıca fagositik elemanlar granülositler (özellikle nötrofiller) ve monositler ile karaciğer, böbrek ve dalak gibi dokularda yerleşen makrofajlardır. Teleostlarda bu hücreler içerisinde en geniş ilgiyi, melanomakrofaj merkezleri olarak tanımlanan bölgesel yığılmalarda tipik biçimde pigment içeren yapılarıyla makrofajlar çeker. Toksik maddelerin etkilerini belirleme amaçlı çalışmalarda, özellikle karaciğerde yer alan melanomakrofajlar çok iyi biyobelirteçlerdir. Sunulan araştırmada baş böbreğinde yer alan makrofajlar apoptotik bir eozinofili fagosite ederken görüntülenmiştir.

Melanomakrofaj merkezleri embriyonik dönemde baş böbreğindeki lenfoid alanlara göç eden monosit/melanomakrofajlar ile retiküler hücreler, plazma hücreleri ve diğer lenfositlerden oluşmaktadır (Kum ve Sekkin, 2011). Esas elemanları olan melanomakrofajların yığınlar halinde, kolayca izlendiği bu yığılımlar genellikle vasküler kanallar içeren argirofilik bir kapsülle çevrilidir (Agius and Roberts, 2003; Borucinska et al., 2009). Diaz-Satizabal and Magor'a göre (2015), kapsülle çevrelenmemiş ve çevrelenmiş halde izlenen merkezler hücre gruplaşmalarının farklı aşamaları ve/veya farklı işlevlerin sürdürüldüğü yerler olabilir.

Hem melanomakrofajların, hem de melanomakrofaj merkezlerinin bulunma sıklıkları ve kapladıkları alan türden türe, organdan organa; ayrıca bireysel anlamda da farklı fizyolojik, çevresel ve patolojik koşullara göre değişebilir (Agius and Roberts, 2003; Melaa et al., 2007; Russo et al., 2007; Borucinska et al., 2009).

Farklı türlerde uygulanan çeşitli histokimyasal yöntemler, melanomakrofajlarda lipofuskin, melanin ve hemosiderin olmak üzere üç farklı pigmentin bulunduğunu göstermiştir. Bunlardan lipofuskin ve melanin yaygın biçimde gözlenmekte, hemosiderin içeriği ise hemolitik anemi gibi bazı patolojik durumlarda artmaktadır.

Sarı-kahverengi bir pigment olan lipofuskin, miktarının arttığı durumlarda seroid olarak tanımlanır. Lizozomlarda parçalanan çeşitli komponentlerden kalan protein ve yağların demir ile katalizlenen oksidatif süreçlerde çapraz bağlanmasıyla oluşan bir polimerdir (Brunk and Terman, 2002; Gray and Woulfe, 2005). Çözünemez ve ekzositozla dışarı da atılamaz, böylece memelilerde olduğu gibi balıklarda da yaşlılıkla giderek artan miktarlarda biriktirilir. Balıklarda lipofuskin/seroid depoları ayrıca besin yetersizliği, bakteriyel ve viral hastalıklar ve toksik maddelerin yarattığı çeşitli patolojik durumlarda da artış gösterir (Agius and Roberts, 2003). Melanin, fagosite edilen hücresel maddelerin degradasyonunda oluşan serbest radikalleri, katyonları ve diğer potansiyel toksik ajanları absorblayıp nötralize edebilen karmaşık yapılı bir polimerdir. Hemosiderin ise yaşlı eritrositlerdeki hemoglobinin katabolizmasından

kaynaklanır, ferrik demir ve protein içerir. Teleostlarda genellikle lipofuskin granülleri ile birlikte, baş böbreğinden ziyade kan yıkımının gerçekleştiği dalakta gözlenir (Agius and Roberts, 2003).

Sunulan çalışmada kontrol grubunda PAF boyama yöntemiyle glikojen ve PAS yöntemiyle de protein içerdikleri belirlenen merkezlerin fagositik aktivitenin başlangıç aşamalarında oldukları düşünülmüştür.

Musikarmin, Turnbull Blue ve Prussian Blue boyama yöntemleriyle yapılan değerlendirmelerde, *P. reticulata* baş böbreğindeki melanomakrofajların pigment içerikleri melanin ve hemosiderin olarak belirlenmiştir. Meseguer et al. (1991) *Dicentrarchus labrax* baş böbreğinde elektron mikroskobuyla yaptıkları incelemelerde, hiç lipofuskin içeren hücre görmediklerini bildirirler. Diaz-Satizabal and Magor (2015) *Carassius auratus'*da böbrekten izole edilen melanomakrofajların Sudan Black B ve asit fosfataz ile nospesifik esteraz yöntemleriyle boyanırken, Prussian Blue yöntemiyle boyanmadığını kaydederler. *P. reticulata* baş böbreğinde ise melanomakrofajlar Turnbull Blue yöntemine reaksiyon vermemişken Prussian Blue ile boyanmaktadır. Bu gibi farklılıklar söz konusu hücrelerde içeriğin sadece türden türe değil, *in vivo-in vitro* olarak da değişebileceğini akla getirmektedir.

4.2.4 Endokrin işlevler: İnterrenal ve kromaffin hücreler

Gallo and Civinini (2003) tarafından yapılan geniş derlemede de bildirildiği üzere; balıklarda yüksek omurgalılardaki gibi kompakt bir adrenal bez yapısı yoktur. Katekolamin metabolizması aminerjik kromaffin hücreler, kortikosteroid metabolizması da steroid üreten interrenal hücreler tarafından yönetilir. Yani balıklardaki interrenal doku memelilerdeki adrenal kortekse, kromaffin doku ise adrenal medullaya homologdur (Sampour, 2008). Bazı türlerde kromaffin hücrelerin posterior böbrek içerisinde de yerleştikleri bilinir, ancak iki tip hücrenin de esas yerleşim yeri anterior böbrek yani baş böbreğidir.

Strese verilecek tepkiler, teleostlarda da hipotalamus-hipofiz-interenal doku ekseni ve hipotalamus-sempatik sinir sistemi-kromaffin doku ekseni olmak üzere

iki yolla düzenlenir (Gallo and Civinini, 2003; Aluru and Vijayan, 2009; Abdel-Aziz et al., 2010).

İnterrenal hücreler cinsiyete, yaşa, üreme dönemine, stres koşullarında da tetikleyen faktöre… göre değişim gösterirler. Bu hücreler başta stres hormonu olarak tanımlanan kortizol olmak üzere kortikosteroidleri salgılar, dolayısıyla stres uyarısına karşı uzantısında interrenal hücrelerde ve nukleuslarında büyüme ile plazma kortizol düzeyinde artış izlenebilir.

Katekolamin salgılayan kromaffin hücreler üzerindeki denetim preganglionik sempatik sinir fibrillerinden salgılanan asetilkolinle sağlanır (Castillo et al., 2009; Perry and Capaldo, 2011). *P. reticulata* baş böbreğinde hematopoetik doku ile renal tübüllere yakın konumlanmış sinir demetleri gözlenmekle beraber, sadece ışık mikroskobu gözlemleriyle sinirsel aktivasyon konusunda herhangi bir yorum getirilmemiş, interrenal ve kromaffin hücreler sadece genel anlamda incelenmiştir.

Rutin histolojik yöntemlerle birbirinden kolayca ayırt edilemeyen bu hücrelerin tanımlanmasında krom tuzları içeren fiksatifler ya da histokimyasal-immünohistokimyasal boyama yöntemleri kullanılabilir. Bu çalışmada ayrım PAS ve MaT histokimyasal boyama yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

Endokrin hücreler *D. labrax* ve *O. mykiss* türlerinde kaudal vena çevresinde de yerleşim gösterirler (Gallo and Civinini, 2003). *P. reticulata* baş böbreğinde ise post kardinal vena ve dalları ile kapillerlerin çevresinde yer alırlar, kaudal vena çevresinde bu hücrelere rastlanmamıştır. Benzer şekilde Civinnini et al (2001) *Gasterosteus aculeatus;* Sampour (2008) *C. auratus;* Abdel-Aziz et al. (2010a) *Epinephilus tauvina;* Chakrabarti and Ghosh (2014) *ise Puntius sarana* türlerinde, baş böbreğindeki endokrin hücrelerin post kardinal vena çevresinde yerleştiklerini rapor etmişlerdir. *Aphanius fasciatus* kromaffin hücrelerinde granül salgılanması üzerinde elektron mikroskobik araştırmalar yapan Crivellato et al. (2006) interrenal hücrelerin dağılım ve düzenlenmesinin çok değişken olduğunu, buna karşın kromaffin hücrelerin her zaman posterior kardinal vena ve kollarının

duvarlarında yerleştiklerini bildirirler. Chakrabarti and Ghosh (2014) tarafından da vurgulandığı üzere, yerleşimin geniş bir farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır.

P. reticulata baş böbreğinde PAS yöntemiyle interrenal hücreler daha koyu renkte boyanmakta, adeta köşeli sınırları da izlenebilmektedir. Açık renkte boyanan kromaffin hücrelerin sınırları ise seçilemez. İnterrenal hücrelerin güçlü bazofilik boyanmaları Chakrabarti and Ghosh (2014) tarafından *P. sarana* için bildirilenlere uygunluk göstermektedir. Ancak bu türde interrenal hücrelerin kromaffin hücrelerden daha büyük oldukları kaydedilmişken *P. reticulata'*da istatistiksel verilerle desteklenen bulgular bunun tam tersidir. Benzer şekilde *E. tauvina* türünde kromaffin hücrelerin daha büyük olduğu bildirilmiştir (Abdel-Aziz et al., 2010a).

MT yöntemiyle boyanan preparatlarda interrenal hücrelerin poligonal şekilleri ile kromaffin hücre sınırları ve iri nukleuslar çok iyi ayırt edilmektedir. *P. sarana*'da ince yapı gözlemlerine göre kromaffin hücreler poligonal şekilliyken, *P. reticulata'*da ışık mikroskobu gözlemlerimiz bu hücrelerin *E. tauvina'*da (Abdel-Aziz et al., 2010a) genelde izlendiği gibi oval-yuvarlak olduğu yönündedir.

D. labrax ve *O. mykiss* (Gallo and Civinini, 2003); *C. auratus* (Sampour, 2008) ve *E. tauvina* (Abdel-Aziz et al., 2010a) türlerinde iki tip kromaffin hücre bulunduğu bildirilse de, *P. reticulata* örneklerinde böyle bir ayrım yapılamamıştır.

Bu noktaya dek karşılaştırmalı olarak verilen bilgiler çerçevesinde, kontrol grubu *P. reticulata* örneklerinde baş böbreğinin histolojik yapısı ayrıntılı biçimde değerlendirilmiş olmaktadır. SLS uygulamasından sonra baş böbreğinde izlenen değişimler istatistiksel farklılıklar da dahil olmak üzere aşağıda ayrı alt başlıklarda değerlendirilmiştir.

4.3 SLS Uygulaması ve Sonuçları

4.3.1 Renal korpüskül ve tübüller üzerindeki etkiler

En düşük konsantrasyonda (3 mg/L) SLS uygulaması sonucunda renal korpüsküllerde hemen göze çarpan değişim Bowman boşluklarındaki genişlemedir. İlk bakışta bu genişlemenin, bir pestisit olan lindan etkisi altındaki *Mugil sp., Cyprinus carpio ve Barbus sp.*' de bildirildiği gibi (Ortiz et al., 2003) glomerulusların büzülmesinden kaynaklanan bir görüntü olduğu düşünülmüştür.

Farklı kimyasalların histopatolojik etkilerinin incelenildiği çalışmalarda, renal korpüsküllerde gözle izlenebilen alan-hacim değişimlerinin ölçümle ortaya konması yoluna genellikle gidilmemiştir (Ortiz et al., 2003; Silva and Martinez, 2007; Camargo and Martinez, 2007; Giari et al., 2007; Jasim, 2013) Oysa matematiksel veriler her zaman daha kesin yorumlar yapılmasını sağlar (Bernet et al., 1999; Roy and Battacharya, 2006; Jafarizadeh et al., 2012). Sunulan tezde kontrol ve uygulama gruplarında sadece histopatolojik değişimlerin izlenmesiyle yetinilmeyerek glomerulus çapları ve Bowman boşluğu ölçümleri de yapılmıştır. Buna göre sadece Bowman alanları değil, glomerulus çapları da genişlemektedir. Bir diğer deyişle uygulama gruplarında glomeruluslar büzülmemekte, tam aksine şişmektedir.

En düşük konsantrasyonda SLS uygulanan grupta glomerulus çapları kontrol grubuna göre çok fazla olmamakla beraber artarken Bowman alanları iki kattan fazla genişlemiştir. Ayrıca renal tübül epitelinde hipertrofi ve atrofi ile vakuolleşmeler, nukleus deformasyonları ve infiltrasyon izlenmiştir. Tübül epitel hücreleri ve tübül lümenleri içerisinde glikojen benzeri granül yığılımı başlamıştır. Ancak bazı renal tübüller stromadan adeta ayrılmış halde ve atrofikken diğer bazılarında herhangi bir histopatolojik olgu gözlenmemektedir.

İkinci uygulama grubunda (6 mg/L) glomerulus çapı kontrole ve ilk uygulama grubuna göre hafifçe büyümeyi sürdürüken Bowman boşluğu kontrole göre ~3,5 kat genişlemiştir. Bowman kapsülünün pariyetal tabakasında hipertrofi izlenmektedir. Hipertrofi ve atrofi tübüllerin epitelinde de belirgindir, ayrıca

infiltrasyon sürerken epitel ve tübül lümenlerinde artan madde yığılımı ağsı görünümden kompakt görünüme doğru farklı aşamalarda gözlenebilmektedir.

Üçüncü grupta, 9 mg/L SLS uygulaması sonucunda glomerulus çapı ve Bowman boşluğuna ilişkin ölçümlerde ilginç bir durum söz konusudur. Bu ölçümlerde 3 mg/L ve 6 mg/L uygulama gruplarında izlenen çarpıcı artış 9 mg/L uygulama grubunda görülmemektedir, üstelik bu gruptaki değerler kontrol grubuna göre düşüktür. Ölçümlerdeki bu beklenmeyen farklılığa benzer bir durum Roy and Bhattacharya (2006) tarafından farklı konsantrasyonlarda arsenik uygulanan *Channa punctatus* gövde böbreğinde, tübül epiteli için rapor edilmiştir. Araştırmacılar, uygulamanın ilk günlerinde absorbsiyon oranının artışıyla hipertrofi sergileyen tübül epitelinde sonraki günlerde normal boyutlara dönüşü renal rejenerasyon olarak nitelendirmişlerdir.

9 mg/L uygulama grubunda hipertrofi, atrofi, vakuolleşme gibi patolojik süreçler devam ederken gözlenen bu istatistiksel farklılığın, hematopoetik dokudaki granülomların sayıca artmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

En yüksek SLS konsantrasyonuna (12 mg/L) maruz kalan son uygulama grubunda renal korpüsküller seçilememektedir, tübüller stromadan genellikle ayrılmış halde hipertrofik, atrofik ve dejenerdir. İnfiltrasyon yoğundur, renal tübül epitellerinde piknotik nukleuslar gözlenmiştir. Glomerulus çapı ve Bowman boşluğu ölçümleri kontrol grubuna göre yine yüksektir.

Özetlemek gerekirse, konsantrasyon artışına paralel olmamakla birlikte SLS'nin glomerulus çapında ve Bowman alanında oluşturduğu değişim, baş böbreğinde olası renal işlevlerin etkilendiğine dair önemli bir bulgudur. 9 mg/L uygulama grubunda izlenen ve yukarıda yorumlanmasına çalışılan ilginç durum bir yana bırakılırsa, uygulama gruplarında glomerulusun büyümesi kapillerlerde dilatasyonu ve muhtemelen kan akışının arttığını göstermektedir. Artan kan akışı filtrasyon hız ve miktarının, yani oluşan idrar miktarının artması demektir (Roy and Bhattacharya, 2006). Böylece daha çok süzüntünün birikeceği Bowman boşluklarının genişlediği düşünülmüştür.

Filtrasyon hız ve miktarının büyük olasılıkla artması sürerken, renal korpüsküller ve tübüller de artan SLS konsantrasyona paralel biçimde giderek belirginleşen yapısal bozulmalar sergilemektedir. Tübül epitelinde hipertofi ile vakuolleşmelerle gözlenen dejenerasyon, arsenik uygulaması sonucunda *C. punctatus'*da da olduğu gibi (Roy and Bhattacharya, 2006) tübüllerde de filtrasyon hızının arttığını destekleyecek histopatolojik kanıtlardır. Kıvrılmış tübüller, tübül epitelinde geniş vakuoler oluşumlar lindan ile kirletilmiş sulardan toplanan balık örneklerinde de yaygın biçimde izlenmektedir (Ortiz et al., 2003).

SLS uygulaması sonucunda izlenen bu değişimler, başta metaller olmak üzere farklı kimyasal maddelerin etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda posterior böbrek için bildirilenlerle büyük ölçüde benzerdir. Örneğin Handy and Penrice (1993), cıva klorid maruziyeti sonucunda *Salmo trutta* ve *Oreochromis mossambicus* türlerinde Bowman´kapsül hücrelerinde şişme rapor etmişlerdir. Thophon et al. (2003) akut ve subkronik kadmiyum maruziyeti sonucu *Lates calcarifer* tübül epitelinde hipertrofi, vakuolleşmeler, piknotik nukleuslar, dejenerasyon ve nekroz; tübüllerde de hidropik şişmeler izlediklerini bildirirmişlerdir. Yine kadmiyum uygulaması, *Dicentrarchus labrax'*da tübül epitelinde çok belirgin vakuolleşeme ve şişmelere neden olmuştur (Giari et al., 2007).

Bowman alanındaki genişlemenin organofosfatlı pestisit Trichlorfon uygulaması sonucunda *Prochilodus lineatus'*da izlendiği üzere glomerulus atrofisine bağlandığı da olmuştur, ancak bu yorum herhangi bir ölçüme dayanmamaktadır (Veiga et al., 2002). Glomerular atrofi filtrasyon yüzeyini azaltır ve giderek süzme işleminin bozulduğunu gösterir. Şu halde genelde artan filtrasyonu işaret eden Bowman alanı genişlemesi her zaman glomerulusda büyümeyle birlikte değil, bazen glomerular atrofi ve tahribat sonucunda da izlenmektedir. Sunulan tezde SLS uygulaması sonucunda glomerulus çaplarında da büyüme ölçülmesi bu bulgulara terstir.

Konuya ilişkin çelişik veriler de yok değildir, Pacheco and Santos (2002) *Anguilla anguilla'*da uzun süreli dehidroabiyetik asit (DHAA) uygulamasıyla glomerulus tahribatı, bitkisel lif ve kraft üretiminde oluşan ve pek çok kimyasalın karışımı olan endüstriyel çamura (BKPME) maruz bırakılan örneklerde ise

glomerular kapillerlerde dilatasyon gözlemişlerdir. Silva and Martinez (2007) ise kentsel kirlilik izlenen bölgelerden topladıkları *Astyanax altiparanae* örneklerinde glomerular kapillerlerde dilatasyon ve dolayısıyla glomeruluslarda büyüme olduğunu, bu durumda Bowman alanlarının daraldığını not etmektedirler.

Yukarıda örneklenen çalışmaların tümü boşaltım işlevi tartışmasız olan posterior böbrekle ilgilidir, dolayısıyla renal işlevleri zaten tartışmalı olan baş böbreği için genelleştirilemezler. Ancak sunulan tezin bulguları, baş böbreğinin olası renal işlevlerine dair histolojik gözlemlerin posterior böbrekte kaydedilenlere çok büyük ölçüde benzer olmasıyla gerçekten ilginçtir.

Uygulama gruplarının baş böbrekleri renal elemanlarda izlenen değişimler, sürfaktanların yine posterior böbrek üzerindeki histopatolojik etkilerine ilişkin çalışmalarda rapor edilenlerle de büyük ölçüde örtüşmektedir Örneğin Rosety et al. (2002) bentik bir tür olan *Scopthalmus maximus* örneklerini anyonik bir sürfaktana, sodyum dodesil sülfat'a 3, 5, 7 ve 10 mg/L konsantrasyonlarda, sırasıyla 384,190,12 ve 4 saat süreyle maruz bırakmışlardır. Uygulama sonucunda böbreklerde epitel vakuolizasyonu ve deskuamasyon gibi parametrelerle belirlenen glomerulus ve renal tübül hasarlarını kaydederler. Araştırıcılar, yaşamsal bir organ olarak böbreğin çok şiddetle etkilenmesinin balıkları mortaliteye dek götürebileceğini de eklemektedirler. Çalışmamızda uygulama gruplarında herhangi bir ölüm olgusu gözlenmemiştir, ancak maruziyet süresinin uzamasıyla etkilerin artacağı kolayca öngörülebilir.

SLS uygulamasıyla baş böbreği tübül epitelinde izlenen bir diğer önemli değişim, hücrelerde ve esas olarak tübül lümenlerinde giderek daha yoğun biçimde izlenen madde birikimidir. Kentsel artıklarla kirletilmiş bölgelerden topladıkları *P. lineatus* örneklerinde posterior böbrek glomerular kapillerlerinde genişleme ve glomeruluslarında büyüme; tübül epitel hücreleri ve nukleuslarında hipertrofi, vakuolleşmeler ve dejenerasyon rapor eden Camargo and Martinez (2007); ayrıca epitelde giderek ağsı bir yapı oluşturan eozinofilik granüllerden söz etmekte ve bu durumu hiyalin dejenerasyonu olarak tanımlamaktadırlar.

Böbrek taşı olarak da tanımlanan bu birikimler, sudaki kimyasalların pH ve iyon dengesini değiştirmesiyle dolaylı olarak ortaya çıkabilecekleri gibi toksik maddelerin doğrudan etkisiyle de oluşabilirler. Örneğin *P. lineatus'*da Trichlorfon (Veiga et al., 2002) *L. calcarifer'*de (Thophon et al., 2003) kadmiyum uygulamasıyla, *A. altiparana'*da kentsel kirlilik etkisiyle (Silva and Martinez, 2007) tübül epitel hücrelerinde hiyalin damlacıkları biriktiği kaydedilmektedir. *Barbus sharpeyi'*de ise salinite değişimleriyle oluştukları not edilmiştir (Jasim, 2013). Ayrıca kültürü yapılan *Hypophtalmichtys molitrix* türünde de bazı yetiştirme alanlarından toplanan örneklerde böbrek taşı oluşum yüzdeleri oldukça yüksektir (Jafarizadeh et al., 2012).

Sunulan araştırmada pH değeri başta olmak üzere su kalitesi parametreleri sabit tutulduğundan, söz konusu madde birikimlerinin SLS'nin doğrudan etkisi ile oluştuğu sonucuna varılmıştır. Bu tür birikimin, olası renal işlevlerin bozulduğunu işaret eden birincil dejeneratif süreçlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3.2 Hematopoetik dokudaki etkiler

P. reticulata baş böbreğinin hematopoetik organizasyonunda SLS uygulaması sonucunda ilk planda göze çarpan durum granülom oluşumlarıdır. Stromadan ayrılmış halde olmalarına rağmen çevrelerinde herhangi bir sınır gözlenemeyen granülomlar farklı boyutlarda, helezon benzeri yapılaşmalardır. Bazılarının içerisinde vakuoller bulunabilir. Epitel kökenli, küçük nukleuslu hücrelerin çoğunlukta olduğu bu oluşumlarda makrofaj benzeri iri hücreler de gözlenebilir.

Granülomlar insan böbreğinde fungal veya bakteriyal enfeksiyonlara veya toksik maddelere tepki olarak ortaya çıkabilirler (Santhanam Ramalakshmi et al.; 2003), tetik faktörleri farklı olsa da oluşum süreçleri benzerdir ve etkilenen bölgeye mononüklear hücrelerin ve makrofajların infiltrasyonuyla başlar. Daha sonra bu hücreler toplanarak kümelenirler ve epiteloid karakterli, çok nukleuslu büyük hücrelere dönüşürler. Lenfositler bu hücre agregasyonunu sararak çember oluştururlar. Bazı granülomlar eozinofiller ve plazma hücreleri yanında fibröz bağ doku hücreleri de içerebilir.

Balıklarda da, ortam parametreleri ile beslenmedeki olumsuzluklar nedeniyle, böbrek dahil farklı organlarda granülom oluşabilir. Akvaryum ortamlarında sıklıkla bulunan mikobakteriyum grubu organizmaların bu duruma sebep olduğu yaygın bir kanıdır (Decostere et al., 2004; Watral and Kent, 2007). Granülomların *Apistogramma cacatuoides, Trichogaster leeri* türlerinde de akvaryum ortamlarında bulunan mikobakteryumlardan kaynaklandıkları bildirilmiştir (Novotny et al., 2010).

Bu tür granülomlarda enfeksiyon kaynağı organizmalar rahatça izlenirken (Landsberg and Paperna, 1992; Luco et al., 1997; Gauthier and Rhodes, 2009; Baumgartner and Hawke, 2011) sunulan tezde hematopoetik doku içerisinde herhangi bir yabancı organizma görülmemiştir. Tez çalışmasında ortam koşulları sabittir ve satın alınan bireylerin denetimli koşullarda çoğaltılmasıyla temin edilen, sağlıklı örnekler kullanılmıştır. Nitekim aynı ortam koşullarında tutulan kontrol grubu örneklerinde granülom oluşumu gözlenmemiştir

Kimyasal madde uygulamaları sonucunda da granülomların gözlenebildiği bilinmektedir, örneğin *Oryzias latipes'*de uzun süreli b-hexachlorocyclohexane uygulaması sonucunda granülom oluşumu kaydedilmiştir (Wester ve Canton 1992). *P. reticulata* baş böbreğinde izlenen granülomların sayısı artan SLS konsantrasyonları paralelinde artmakta, bu durum söz konusu yapıların SLS uygulaması sonucunda ortaya çıktıklarına dair düşünceyi kuvvetlendirmektedir.

Ayrıca, enfeksiyon kaynaklı granülomların önce karaciğer ve dalak parenkiminde ve/veya bunları çevreleyen bağ dokuda gözlendiği (Joerg Mayer, 2004), sonraki 7-14 gün içinde büyüyüp yaygınlaştıkları rapor edilmiştir (Baumgartner and Hawke, 2011). Sunulan tezde total kesitler bu yönden dikkatle değerlendirilmiş; ancak ne karaciğer, ne de dalakta granülomlara rastlanmamıştır. Dolayısıyla hematopoetik dokudaki granülomların SLS uygulamasına bağlı olarak oluştuğu kanısı daha da güçlenmekte, dokunun sürfaktanlara karşı hızlı ve yüksek duyarlılık gösterdiği sonucuna varılmaktadır. Çevresel koşulların çok değişken olduğu doğal ortamlarda bu duyarlılığın daha da artacağı, yani balıkların özgül savunma mekanizmalarının, SLS gibi anyonik sürfaktanlardan çok olumsuz etkileneceği rahatça akla gelmektedir.

Hematopoetik dokuda 3 mg/L SLS uygulamasından başlayarak izlenen hemoraji ve 6 mg/L uygulamasından itibaren giderek genişleyen nekrotik alanlar,

bu olumsuz etkinin ciddiyetini ortaya koyar. Bunlar dışındaki değişimler her bir hematopoetik seri için aşağıda ayrı ayrı ele alınmıştır.

***Eritropoezis*:** Eritropoetik süreç artan konsantrasyonlarda SLS uygulamasına maruz kalan örneklerde de tüm aşamalarda izlenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece olgun eritrositlerdeki bazı nukleus değişimleri dikkat çekmiştir. Bütün uygulama gruplarında olgun eritrositlerin bazılarında loplu, çentikli ve at nalı şeklinde nukleuslar yer almakta, buna karşın tomurcuklanma ve mikronukleus oluşumu gözlenmemektedir. Bu bulgular madde uygulamalarının kan parametreleri üzerine etkileri ile ilgili çalışmaların verileriyle örtüşmektedir (Jiraungkoorskul et al. 2007; Kosai et al. 2011; Ghisi, 2012).

***Granülopoezis*:** Nötrofil serisinin 3 ve 6 mg/L uygulama gruplarında tüm elemanları seçilebilirken, 9 mg/L uygulama grubunda hiçbir olgunlaşma aşaması izlenememiş, 12 mg/L uygulama grubunda ise sadece iki parçalı nötrofil aşaması kaydedilebilmiştir. İzlenebilen seri elemanlarında SLS uygulamasından kaynaklanan herhangi bir değişim yoktur.

Eozinofil serisinin tüm elemanları bütün SLS uygulama gruplarında ayırt edilmiş ve farklılaşma aşamalarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu seride uygulama sonucu izlenen tek farklılık, değişik olgunlaşma aşamalarındaki eozinofilik elemanlara tüm uygulama gruplarında daha sık rastlanmasıdır. Eozinofil serisi elemanlarının uygulama gruplarında daha fazla izlenmesi olası bir eozinofili işareti olarak değerlendirilebilir. Balıklarda da, homeostatik koşullar altında kan ve dokularda eozinofillere nadiren rastlandığı, ancak enflamasyonda, hematolojik hastalıklarda ve olası alerjik durumlarda bu hücrelerin sayıca arttığı bilinir; örneğin kronik olarak helmint antijenlerine maruz kalan *D. rerio'*da eozinofili izlenir (Balla et al., 2010). Bu durumda SLS uygulaması sonucunda eozinofilik seri elemanlarında izlenen artış en azından homeostazisin bozulduğunun kanıtıdır.

***Agranülopoezis*:** Granülsüz lökositlerden lenfosit serisinde, kontrol grubunda gözlenebilen ancak uygulama gruplarında izlenemeyen bazı gelişim aşamaları vardır. 3 mg/L uygulama grubunda plazmosit dışında tüm elemanlar

gözlenmiştir. 6 mg/L uygulama grubunda da proplazmosit ve plazmositler seçilememiştir. Plazmositler 9 mg/L uygulama grubunda da ayırt edilememiştir. En yüksek konsantrasyondaki (12 mg/L) uygulama grubunda ise lenfoblast, prolenfosit ve lenfositler izlenebilmiştir. Gözlenebilen seri elemanlarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında herhangi bir hücresel farklılık yoktur.

SLS uygulaması sonrasında monosit serisinde de lenfosit serisine benzer olarak bazı gelişim aşamaları izlenememiştir. 3 mg/L uygulama grubunda serinin monosit ve makrofajlar dışındaki elemanları ayırt edilememiştir. 6 mg/L uygulama grubunda sadece makrofajlar, 9 mg/L uygulama grubunda monosit dışında tüm elemanlar, 12 mg/L uygulama grubunda ise yine sadece makrofajlar gözlenebilmiştir.

4.3.3 Lenfoid doku ve melanomakrofaj merkezlerindeki değişimler

Genellikle yapısı bozulan renal korpüskül ve tübüllerin civarında ve az sayıda hücreden oluşan gruplar, küçük adacıklar halinde izlenen melanomakrofaj merkezleri, özellikle granülom sayısının çarpıcı biçimde arttığı 9 mg/L uygulama grubundan başlayarak hem alan olarak genişlemekte, hem de sayıca artmaktadır. Aynı grupta Bowman boşluğu ve glomerulus çap değerlerinde izlenen düşmenin, çoğalan granülom sayısına bağlandığı hatırlanırsa, bu beklenebilir bir durumdur. Bir diğer deyişle granülomların artışı sadece renal korpüskülleri sıkıştırmakla kalmamakta, melanomakrofaj merkezlerinin çoğalmasına da neden olmaktadır. Ayrıca artan SLS konsantrasyonu nekrotik alanların genişlemesine, bu da ölü hücreleri yok etmekle görevli hücrelerin yığıldığı merkezlerin sayısında artışa neden olmaktadır.

Hoplias malabaricus karaciğer ve baş böbreğinde metil cıva uygulamasına dair sonuçları veren Mela et al. (2007) tarafından da belirtildiği üzere, melanomakrofaj merkezleri sayısındaki artış, çeşitli kimyasalların etkisine dair iyi bir biyobelirteçtir ve izlendiği organda fagositik aktivasyonun arttığını kanıtlar. Jasim (2013) baş böbreğinin hematopoetik işlevleri uzantısında posterior böbreğe oranla daha hassas olduğunu ve melanomakrofaj merkezlerindeki artışın da baş

böbreğinde daha belirgin biçimde izleneceğini kaydetmektedir. Mela et al. (2007), aynı türde sadece metil cıva değil inorganik kurşun ve tributiltin etkisiyle de baş böbreğinde melanomakrofaj merkezlerinin sayıca arttığını bildirmişlerdir.

Özgül olmayan bağışıklık tepkimelerinde görev yapan başlıca fagositik elemanlardan eozinofilik seri elemanlarındaki artış ve monosit serisi elemanlarından makrofajların tüm uygulama gruplarında izlenmesi, SLS uygulamasına gösterilen immün tepkinin göstergeleridir. Bu tepkiye uygulama gruplarında artan infiltrasyonla karakterize edilen yangı da eklenmektedir. Ayrıca en düşük uygulama grubundan başlayarak dokuda hemoraji ve giderek artan nekroz izlenmiştir. Bütün bunlar birlikte değerlendirildiğinde SLS uygulaması sonucunda hematopoetik dokuda homeostazisin ciddi ölçüde bozulduğu ve bağışıklık tepkimelerinin tetiklendiği, ayrıca enflamasyon oluştuğu ve dokunun giderek nekrotize olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durumun tüm kan parametrelerini çok olumuz etkileyeceği açıktır.

4.3.4 İnterrenal ve kromaffin hücrelerdeki değişimler

Kanda oksijen düzeyinin düşmesi (hipoksi) ve karbondioksit düzeyi artışı (hiperkapni), metabolik asidosiz, anemi, anestezi, beslenme rejimi ve su sıcaklığı değişimi, besinlere ve/veya ortama karışan kimyasal maddeler… gibi pek çok faktör diğer omurgalılarda olduğu gibi balıklarda da stres yaratır. Chakrabarti and Ghosh (2014) tarafından erkek *Puntius sarana*; Civinini et al (2001) tarafından da yine erkek *Gasterosteus aculeatus* örneklerinde bildirildiği üzere, interrenal ve kromaffin hücrelerin büyüklük ve aktivasyonları üreme dönemine göre de değişebilir. Stres faktörlerinin etkisiyle genelde katekolaminlerin plazma düzeylerinde artış olduğu genel bir kabul görür, ancak bu durum stres yaratan faktöre göre değişebilir (Perry and Capaldo, 2011).

Teleostlarda başta sıcaklık şokları olmak üzere farklı çevresel koşulların çeşitli ilaçların ve toksik maddelerin etkisiyle oluşan stresin etkileri interrenal ve kromaffin hücrelerdeki histopatolojik değişimlerle ya da plazmada katekolamin ve kortikosteroidlerin düzeylerinde oluşan değişimlerle izlenebilir (Dorval and Hontela, 2003). Örneğin Gallo and Civinini (2003) tarafından kaydedildiği üzere;

sıcak ya da soğuk şok uygulaması bazı türlerde endokrin hücrelerin ve nukleuslarının önce büyümesine, sonra yeniden küçülmesine yol açabilir. Yüksek ısı ile oluşan şok interrenal hücrelerde süreye bağlı olarak hiperplazi ve hipertrofi oluştururken plazmada kortizol değerlerinin yükselmesine de yol açar (Mezhnin, 1978, Chen et al, 2002). *P. reticulata* örneklerinin soğuk suya aktarılmasıyla yapılan başka bir deneyde kromaffin hücrelerinin nukleuslarında kayda değer bir büyümenin gözlendiği ancak 4. günden sonra kontrol grubundaki büyüklükte kaldığı bildirilmiştir (Gallo and Civinini, 2003). Benzer durum, hipotalamus-hipofiz-interrenal ekseninin başlangıcında da izlenebilir. Metaller başta olmak üzere çeşitli kirleticilere kronik maruziyet, hipotalamusta kortikosteroid serbest bıraktırıcı faktörleri (CRH) salgılayan hücrelerde hipertrofi ve hiperplaziye neden olur (Gallo and Civinini, 2003).

Çevresel kirlilik başlı başına bir stres faktörüdür, ancak teleostlarda çevresel kimyasallar-interenal hücreler bağlantısı hakkında yapılmış çalışmalar çok da fazla değildir. *Salmo trutta'*da ağır metal kontaminasyonu (Norris et al., 1997); *Polyodon spathula* örneklerinde de poliklorlu bifeniller ve klordan maruziyeti sonucunda (Gundersen et al., 2000) interrenal hücre ve nukleuslarında hipertrofi oluştuğu rapor edilmiştir. Silva ve Martinez (2007), bu olgunun iyi bir stres biyobelirteci olduğunu vurgulayarak, kentsel kirliliğin etkisindeki bölgelerden topladıkları *Astyanax altiparanae* örneklerinde interrenal hücrelerin ve nukleus çaplarının belirgin biçimde büyük olduğunu kaydederler.

Fakat bu konuda da çelişik raporlar vardır, örneğin kraft kağıdı üretim atıklarına maruz kalan *Esox lucius* ve *Perca flavescens* örnekleriyle (Hontela et al., 1997; ortamdan ve besinler aracılığı ile yine poliklorlu bifenillere maruz kalan *Onchorhynchus mykiss* ve *Oreochromis mossambicus* (Quabius et al., 2000) örneklerinde interrenal hücre ve nukleus alanlarında azalma yani atrofi izlenmiştir. Silva ve Martinez (2007), bu çelişkiyi kimyasal stresi oluşturan faktörün ne olduğuna ve şiddetine bağlarlar. Ancak poliklorlu bifenillerin bir türde hipertrofi, diğer iki türde atrofi oluşturması mekanizmanın sanıldığından çok daha çapraşık olduğunu ortaya koymaktadır.

Görüldüğü üzere stres, farklı nedenlerle oluşan ve çok farklı düzeylerde, çok karmaşık mekanizmalarla yönetilen bir süreçtir. Sunulan tezde SLS uygulaması sonucunda oluştuğu düşünülen bu süreç sadece interrenal ve kromaffin hücrelerde oluşan bazı değişimlerle ortaya konmaya çalışılmıştır.

SLS uygulamasıyla bu hücrelerde ışık mikroskobu düzeyinde net bir histopatolojik değişim izlenemediği ortadadır. Bu nedenle hücre ve nukleus çap ölçümlerinden elde edilen istatistiksel verilerin değerlendirilmesine ağırlık verilmiştir. Değerlendirme sonuçları, her iki hücre tipinde de SLS uygulaması sonucunda hücre ve nukleus çaplarının arttığı yönünde olup Norris et al. (1997); Gundersen et al. (2000) ve Silva ve Martinez (2007) tarafından verilen bilgilere paraleldir. Bir diğer deyişle, yapılan uygulama *P. reticulata* baş böbreğinde yer alan interrenal ve kromaffin hücrelerde hipertrofiye yol açmıştır. Her iki hücre çapında da, kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır.

Bu genel yargı detaya girildiğinde ilginç bazı durumlar sergiler. Her iki hücrenin çaplarına ilişkin veriler Levene test sonuçlarına göre heterojen dağıldıkları halde Kruskal-Wallis test sonuçlarına göre anlamlı bir farklılık gösterirler. Bu durum, hipertrofinin uygulanan SLS konsantrasyonuna paralel olmadığı yönünde yorumlanabilir, üstelik buradaki heterojenite beklenildiği gibi 9 mg/L uygulama grubunda değil, her iki hücre için de 6 mg/L uygulama grubunda belirgindir. En düşük (3 mg/L) uygulama grubunda büyüyen hücre çapları 6 mg/L SLS uygulamasında adeta küçülmekte, sonra tekrar büyümeyi sürdürmektedir.

Bu konuya getirilebilecek tek yaklaşım, ilk uygulama grubunda strese verilen tepkiyle hormon sentezlenmesinin artarak hücrelerin büyümesine yol açtığı, ikinci grupta ise muhtemelen hormon salınması nedeniyle hücre çaplarının küçülmüş olduğu yönünde olup son derce geneldir. Böylesi bir yaklaşım 9 mg/L uygulama grubunda glomerulus çapı ve Bowman boşluğuna ilişkin ölçümlerde izlenen farklılığı da açıklayabilir: Yukarıda da belirtildiği üzere bu parametrelerde 3 mg/L ve 6 mg/L uygulama gruplarında izlenen çarpıcı artış, 9 mg/L uygulama grubunda görülmemektedir. Bu duruma, strese karşı gösterilen tepkiyle bazı mekanizmaların geçici olarak düzeltilmeye çalışılması yol açmış

olabilir. Bu düzeltme işlemi beklenildiği üzere SLS konsantrasyonu arttıkça yetersiz kalmakta, hücreler tekrar hormon sentezleme-büyüme moduna geçmekte, dokuda genel anlamda izlenen dejenerasyon bu tepkiden daha hızlı biçimde ilerlemektedir. Ancak bütün bu düşünceler sadece hipotetiktir, interrenal hücrelerin SLS ile oluşturulan kimyasal strese verdikleri tepkinin çok daha net biçimde anlaşılabilmesi için aynı gruptaki çok sayıda örneğe giderek artan SLS konsantrasyonu uygulanması ve her konsantrasyon değişiminin etki etmesi beklendikten sonra hem hem histopatolojik değerlendirme ve istatistiksel analizlerin, hem de plazmada hormon ölçümlerinin yapılması gerekir.

Kromaffin hücre çaplarında izlenen büyümede de benzer bir durum söz konusudur. En düşük uygulama grubunda başlayan hipertrofi ikinci uygulama grubunda (6 mg/L) azalmakta, sonra belirgin biçimde artarak sürmektedir. İnterrenal hücrelere paralel biçimde izlenen ve verilerin homojen dağılmaması anlamına gelen, ancak kontrol ve deneme grupları arasında hücre çapı bağlamında anlamlı bir fark bulunduğunu da gösteren bu seyir gerçekten ilginçtir.

Elbette ki sadece hipertrofiye dayanılarak kesin bir yorum getirilemez, ancak *P. reticulata'*da her iki hücre çapının da SLS uygulamasıyla arttığı ortadadır. Oysa nöroendokrin mekanizmalarla, yani çok daha hızlı biçimde kontrol edilen bir süreç olarak katekolamin salınma mekanizmasının; endokrin yolla, daha yavaş denetlenen kortikosteroid salınma mekanizmasına paralel olması beklenen bir durum değildir. Bir başka deyişle akut strese verilen hızlı tepki kromaffin hücrelerden salgılanan katekolaminlerin plazma düzeyini artırır. Kronik stres tepkisi ise interrenal hücrelerden salgılana kortikosteroidlerle plazmada kortizol düzeyinin artmasıdır. Bu genel bilgilere göre 96 saatlik SLS uygulamasıyla akut stres oluşması, histolojik olarak da özellikle kromaffin hücrelerde hipertrofi izlenmesi beklenir, oysa her iki hücrede de hipertrofi izenmiştir.

Balıklarda stres endokrinolojisi üzerinde yaptığı çok geniş çaplı derlemede Pankhurst (2011) tarafından, kortikosteroid düzeyindeki değişimlerin balıklarda her zaman çevresel strese maruz kalma belirteci olmayacağının bildirilmesi durumu daha da karışık hale getirir. Çünkü bu bildirim Norris et al. (1997);

Gundersen et al. (2000) ile Silva ve Martinez (2007) tarafından kaydedilenlere uygun değildir; bu araştırıcılar yukarıda da vurgulandığı üzere hipertrofiyi aktivasyon artışı olarak yorumlamışlardır. *P. reticulata'* da her iki hücrenin de çapları (aktivasyonu?) paralel biçimde artmaktadır. Pankhurst (2011) ise plazma kortizol düzeyinin çok değişken olduğunu, hava koşullarından kan örneği alınması sırasında kanül kullanımına… dek çok farklı nedenlerle de artabileceğini not etmektedir. Bu durumda, çalışmamızda interenal hücre ve nukleuslarında izlenen değişim SLS uygulamasından bağımsız olarak da ortaya çıkmış olabilir. Buna karşın kromaffin hücre çaplarında izlenen heterojen büyümenin SLS'ye bağlı biçimde oluştuğu düşünülebilir.

Ancak bu düşünce de nukleus çaplarına ilişkin istatistiksel verilerle desteklenmemektedir. İstatistiksel verilerimiz interrenal hücre nukleuslarında izlenen büyümenin kontrollere göre anlamlı olduğunu göstermektedir. Ancak kromaffin hücre nukleusları kontrollere göre anlamlı biçimde büyümemiştir. Akut tepki verdiği düşünülen kromaffin hücrelerde büyüme sürerken nukleusların büyümemesi, aktivasyon konusundaki yaklaşımların bir kez daha gözden geçirilmesini gerektirir.

Çalışmamızda plazma hormon düzeyleri ölçülmediğinden sadece çelişik bilgilerin karşılaştırılmalı olarak verilmesi ve açık noktaların işaret edilmesiyle yetinilmiştir. Stres gibi son derece karmaşık bir mekanizmanın sadece ışık mikroskobu gözlemleri ve ölçümleriyle yorumlanabilmesi elbette ki olası değildir. Ancak stres-baş böbreği ilişkileri çok daha detaylı araştırmalara konu olacak kadar merak uyandırıcıdır.

4.4 Sonuç

Sunulan tez çalışmasının bulgularının, ulaşılabilen kaynaklarla karşılaştırılarak yorumlanmasıyla varılan genel sonuçlar aşağıda maddeler halinde sıralanmaktadır.

❖ Çok yaygın kullanılan kimyasallar olarak sürfaktanlar, asla düşünüldükleri ya da satış-pazarlama amaçlı öne sürüldükleri kadar masum bileşikler değildir. Bu durum yüksek çözünürlüklü sürfaktanlar için de geçerlidir.

❖ Bu maddelerin sucul canlılar ve özellikle de balıklar üzerindeki etkilerinin belirlenmesine yönelik araştırmalarda histopatolojik verilerin taşıdığı büyük önem artarak sürmektedir.

❖ Çalışmamızda kullanılan *P. reticulata* hem histopatolojik, hem de daha ileri düzeylerdeki araştırmalar için gerçekten dayanıklı ve uygun bir türdür.

❖ Toksik maddelerin farklı düzeylerdeki etkilerinin belirlenmesine yönelen araştırmalarda çok işlevli yapısıyla baş böbreği ideal bir çalışma materyalidir. Boşaltım, kan yapımı, endokrin işlevler gibi farklı fizyolojik süreçlerin tek organ üzerinden değerlendirilmesini sağlar. Genellikle solungaç-deri ve karaciğer ekseninde sürdürülen çalışmalarda baş böbreğinin de değerlendirilmeye alınması daha ayrıntılı bilgiler sağlayacaktır.

❖ Sunulan çalışmada *P. reticulata* baş böbreği ile kaudal böbrek ayrımının yapılması, mevcut kaynaklardaki bazı kavramsal karmaşaların giderilmesine katkıda bulunabilir.

❖ En azından bu tür için, baş böbreğinde kısıtlı da olsa renal işlevlerin sürdüğü düşünülmektedir. Uygulama sonucunda Bowman alanları ve glomerulus boyutlarında izlenen değişim, filtrasyon hız ve miktarının etkilendiğinin kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

❖ Renal işlevlere ilişkin değerlendirmeler, teleost böbreğinin evrim sürecindeki durumu açısından önemli olacağı düşünülen geniş bir tartışmaya açıktır.

❖ SLS uygulamasıyla *P. reticulata'*da baş böbreği yapısı ciddi ölçüde etkilenmiş ve tüm elemanlar açısından bakıldığında hipertrofi-hiperplazi-vakuolleşmeden; hemoraji-yangı-granülom oluşumu-atrofi-nekroza dek genişleyen bir yelpazede giderek bozulmuştur.

❖ Bu yapısal değişimin işlevleri etkilemesi kaçınılmazdır. Hematopoetik serilerde belirgin bir değişim izlenmemiş olsa da, hematopoetik dokudaki çok

ciddi bozulmanın kan yapım süreçlerini kesinlikle olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir. Hematopoezisin bozulması tüm fizyolojik işlevleri bozabilir.

❖ Hematopoetik dokuda gerçekleşen eritropoesiz, granülopoesiz ve lenfopoezis aşamaları *P. reticulata* türünde ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuştur. Tez çalışmasının geniş kapsamı, hakkında herhangi bir veri sağlanamayan trombopoezis sürecinin daha ayrıntılı olarak araştırılmasını engellemiştir. Ancak mevcut verilerle türler arası farklılığın evrimsel açılımı hakkında farklı yaklaşımlarda bulunulabilecektir.

❖ Balıklarda bağışıklık sistemine dair bilgiler çerçevesinde melanomaktofajların önemli rolü bu çalışmayla da gösterilmiş, ayrıca uygulama gruplarında eozinofilk seri elemanlarının daha fazla izlenmesi de immün sistem tepkisi olarak değerlendirilmiştir. Hematopoetik dokunun immün işlevleri hakkında geniş bir çalışma alanı bulunduğu açıktır.

❖ Düşük karbon sayısı ve hızlı biyobozunumu dikkate alınarak, SLS'nin sucul ekosistemlerdeki zararlarının tolere edilebileceği kanısı, sadece yükselen konsantrasyonlar paralelinde görülme sıklıkları artan granülomlar dikkate alındığında bile hatalıdır.

❖ Baş böbreğinin endokrin işlevlerine yönelik araştırmalarda kullanılacak daha gelişmiş yöntemlerle, özellikle kimyasallardan kaynaklanan stresin fizyolojisi hakkında yeni bulgular ortaya konabilecektir.

Bu sonuçlar çerçevesinde değerlendirilen tez çalışmasının, özelde sürfaktanlar ve genelde de toksik kimyasalların, teleostlardaki farklı fizyolojik süreçler üzerindeki etkileri hakkında yeni ve farklı bakış açıları getirebilmesi umulmaktadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abdel-Aziz, E. S. H., Abdu, S., El-Sayed Ali, T. S. and Fouad, H., 2010b, Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study, *Fish Physiology and Biochemistry,* 36:323-336 pp.

Abdel-Aziz, E. S. H., El-Sayed Ali, T., Abdu, S. and Fouad, H., 2010a, Chromaffin cells and interrenal tissue in the head kidney of the grouper, *Epinephilus tauvina* (Teleostei, Serranidae): a morphological (optical and ultrastructural) study, *Journal of Applied Ichthyology*, 1-6 pp.

Agamy, E., 2012, Histopathological liver alterations juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil and dispersant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171-179 pp.

Agius, C. and Roberts, R., 2003, Melano-macrophage centres and their role in fish pathology, *Journal of Fish Diseases,* 26:499-509 pp.

Alcaraz, G., Rosas, C. and Espin, S., 1993, Effect of detergent on the response to temperature and growth of grass carp, *Ctenopharyngodon iclella, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 50:659-664 pp.

Aluru, N. and Vijayan, M. M., 2009, Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling, *General and Comparative Endocrinology,* 164:142-150 pp.

Ankley, G. T. and Villeneuve, D., 2006, The fathead minnow in aquatic toxicology: past, present and future, *Aquatic Toxicology,* 75:91-102 pp.

Balla, K. M., Lugo-Villarino, G., Spitsbergen, J. M., Stachura, D. L., Hu, Y., Bañuelos, K., Romo-Fewell, O., Aroian, R. V., and Traver, D., Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants, *Blood,* 116(19):3944-3954 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Barbieri, E., Ngan, P. and Gomes, V., 1998, The effect of sodium dodecyl sulfate, on the metabolism and swimming capacity of *Cyprinus carpio*, *Revista Brasileira de Biologia.,* 2:263-271 pp.

Bardach, J., Fujiya, M. and Holl, A., 1965, Detergents: effects on the chemical senses of the fish *Ictalurus natalis* (le Sueur), *Science,* 148:1605-1607 pp.

Baumgartner, W. A. and Hawke, J., 2011, Bacterial Diseases Cause Granulomas In Fish, *Global Aquaculture Advocate Magazine,* July/August 2011:34-35 pp.

Becker, K., Fishelson, L. and Amselgruber , M., 2001, Cytological ontogenesis and involution of the thymus and head-kidney in juvenile and old domestic carp: is ageing in fish a chronological or growth-related phenomenon, *J. Journal of applied ichthyology,* 17:1-13 pp.

Bennett, C. M., Kanki, J. P., Rhodes, J., Liu, T. X., Paw, B. H., Kieran, M. W. Langenau, D. M., Delahaye-Brown, A., Zon, L. I., Fleming, M. D. and Look, T. A., 2001, Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*, *Blood,* 98(3):643-651 pp.

Berman, J. N., Kanki, J. P. and Look , T. A., 2005, Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis, *Experimental Hematology,* 33:997-1006 pp.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm and Wahli, T., 1999, Histopathology in Fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution, *Journal of Fish Diseases,* 22:25-34 pp.

Bielinska, I. and Terlecki, J., 1984, Dielectric studies on the reaction of the intracellular matter of fish red blood cells to detergent toxicity, *Physics in Medicine and Biology,* 29(5):525-534 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Boehm, T. and Bleul, C. C., 2007, The evolutionary history of lymphoid organs. *Nature Immunology,* 8(2):131-135 pp.

Borucinska, J. D., Kotran, K., Shackett, M. and Barker, T., 2009, Melanomacrophages in three species of free-ranging sharks from the northwestern Atlantic, the blue shark *Prionacae glauca* (L.), the shortfin mako, *Isurus oxyrhinchus* Rafinesque, and the thresher, *Alopias vulpinus* (Bonnaterre), *Journal of Fish Diseases,* 32:883-891 pp.

Botham, J. W. and Manning, M. J., 1981, The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenic development of allograft reactivity, *Journal of Fish Biology,* 19:403-414 pp.

Bowden, T. J., 2008, Modulation of the immune system of fish by their environment, *Fish and Shellfish Immunology,* 25:373-383 pp.

Breuil, G., Vassiloglou, B., Pepin, J. F. and Romestan, B., 1997, Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Fish and Shellfish Immunology,* 7:29-43 pp.

Bromage, E., Kaattari, I., Zwollo, P. and Kaattari, S., 2004, Plasmablast and plasma cell production and distribution in trout Immune tissues, *The Journal of Immunology,* 174:7317-7323 pp.

Brunelli, E., Talarico, E., Corapi, B., Perrotta, I. and Tripepi, S., 2008, Effects of a sublethal concentration of sodium lauryl sulphate on the morphology and Na+/K+ ATPase activity in the gill of the ornate wrasse (*Thalassoma pavo*), *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 71:436-445 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Brunk U.T., and Terman A. (2002), Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology Medicine,* 2002 Sep 1;33(5):611-619 pp.

Buh, K. and Hamilton, S., 2000, Acute toxicity of fire-control chemicals, nitrogen chemicals, and surfactants to rainbow trout, *Transactions of the American Fisheries Society,* 129:408-418 pp.

Byrne, P., Speare, D. and Ferguson, H., 1989, Effects of a cationic detergent on the gills and blood chemistry of rainbow trout *Salmo gairdneri*, *Diseases of Aquatic Organisms,* 6:185-196 pp.

Camargo, M. M. and Martinez, C. B., 2007, Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream, *Neotropical Ichthyology,* 5(3):327-336 pp.

Cancalon, P., 1983a, Influence of a detergent on the catfish olfactory mucosa, *Tissue Cell,* 15:245-258 pp.

Carradice, D. and Lieschke, G., 2008, Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood,* 111:3331-3342 pp.

Castillo, J., Teles, M., Mackenzie, S. and Tort, L., 2009, Stress-related hormones modulate cytokine expression in the head kidney of gilthead seabream (*Sparus aurata*), *Fish and Shellfish Immunology,* 27:493-499 pp.

Chakrabarti, P., Ghosh, S. J. 2014, Cyclical changes in interrenal and chromaffin cells in relation to testicular activity of olive barb, *Puntius sarana* (Hamilton), *Archives of Polish Fisheries* 22:151-158pp

Chantanachookhin, C., Seikai, T. and Tanaka, M., 1991, Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish, *Aquaculture,* 99:143-155 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chaturvedi, V. and Kumar, A., 2010, Toxicity of sodium dodecyl sulfate in fishes and animals. A review, *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology,* 1(2):630-633 pp.

Chistiakov, D. A., Hellemans, B. and Volckaert, F., 2007, Review on the immunology of European sea bass *Dicentrarchus labrax*, *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 117:1-16 pp.

Civinini A., Padula D., and Gallo V. P. 2001, Ultrastructure and histochemical study on the interrenal cells of the male stickleback (*Gasterosteus aculeatus,* Teleostei), in relation to the reproductive annual cycle, *Journal of Anatomy,* 199: 303-316 pp.

Costa, P. M., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelVales, T. A., Costa, M. H., 2011, Estuarine ecological risk based on hepatic histopathological indices from laboratory and in situ tested fish, *Marine Pollution Bulletin,* 62:55-65 pp.

Covello, J., Bird, S., Morrison, R., Bridle, A., Battaglene, S., Secombes, C. and Nowak, B., 2013, Isolation of RAG-1 and IgM transcripts from the striped trumpeter (*Latris lineata*), and their expression as markers for development of the adaptive immune response. *Fish and Shellfish Immunology,* 34:778-788 pp.

Crivellato, E., Civinini, A., and Gallo, V. P., 2006, Chromaffin cells in the adrenal homolog of *Aphanius fasciatus* (teleost fish) express piecemeal degranulation in response to osmotic stress: a hint for a conservative evolutionary process. *The Anatomical Record,* 288A:1077-1086 pp.

Cserhati, T., Forgacs, E. and Oros, G., 2002, Biological activity and environmental impact of anionic surfactants, *Environment International,* 28:337-348 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dahm, R. and Geisler, R., 2006, Learning from small fry: the zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species, *Marine Biotechnology,* 8:329-345 pp.

Davidson, G. A., Lin, S.-H., Secombes, C. J. and Ellis, A. E., 1997, Detection of specific and ‘ constitutive’ antibody secreting cells in the gills, head kidney and peripheral blood leucocytes of dab (*Limanda limanda*), *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 58:363-374 pp.

Demir, N., 2009, İhtiyoloji, Nobel Yayın Dağıtım, 424s.

Diago, M., Lo´pez-Fierro, P., Razquin, B. and Villena, A., 1998, In vitro haemopoiesis induced in rainbow trout pronephric stromal cell line TPS, *Fish and Shellfish Immunology,* 8:101-109 pp.

Diaz-Satizabal, L., and Brad G. Magor, B. G. (2015), Isolation and cytochemical characterization of melanomacrophages and melanomacrophage clusters from goldfish (*Carassius auratus,* L.), *Developmental and Comparative Immunology* 48: 221-228 pp.

Dorval, J., Leblond, V. S. and Hontela, A., 2003, Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide, *Aquatic Toxicology,* 63:229-241 pp.

Ellis, A. E., 1977, Ontigeny of the immun response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and the apperance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. In: J. B. Solomon and J. D. Horton, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, *Developmental Immunology,* 225-231 pp.

Ellis, A. E., 2001, Innate host defence mechanism of fish aganist viruses and bacteria, *Developmental and Comparative Immunology,* 25:827-839 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Esteban, M. and Meseguer, J., 1994, Phagocytic defence mechanism in sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): an ultrastructural study, *The Anatomical Record,* 240(4):589-597 pp.

Esteban, M., Meseguer, J., Ayala, A. G. and Agulleiro, B., 1989, Erythropoiesis and thrombopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study, *Archives of Histology and Cytology,* 52(4):407-419 pp.

Esteban, M., Muñoz, J. and Meseguer, J., 2000, Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies, *The Anatomical Record 2000,* 258(1):80-89 pp.

Fijan , N., 1961, Haemopoietic function of kidneys in some species of freshwater fish, *Bioloski Glasnik,* 14:167-208 pp.

Fijan, N., 2002a, Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish, *Journal of Fish Biology,* 60:999-1014 pp.

Fijan, N., 2002b, Composition of main haematopoietic compartments in normal and bled channel catfish, *Journal of Fish Biology,* 60:1142-1154 pp.

Filatreau, S., Six, A., Magadan, S., Castro, R., Sunyer, O. J. and Boudinot, P., 2013, The astonishhing diversity of Ig classes and B cell repertoires in teleost fish, *Frontiers in Immunology,* 4(28):1-14 pp.

Fishelson, L., 1996, Ontogenesis and functional metamorphosis of the head-kidney in bottomspawner and mouthbrooder cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei), *Journal of Morphology,* 229:1-21 pp.

Fishelson, L., 2006, Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae,Teleostei) as bioindicators of stress, *Journal of Morphology,* 267:57-69 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Flerova, E. and Balabanova, L., 2013, Ultrastructure of granulocytes of teleost fish (Salmoniformes, Cypriniformes, Perciformes), *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology,* 49(2):223-233 pp.

Forrester, M. A., Berman, J. N. and Payne, E. M., 2012, Myelopoiesis and myeloid leukaemogenesis in the zebrafish, *Advances in Hematology*, 1-12 pp.

Fournie, J. W. and Hawkins, W. E., 2002, Exocrine pancreatic carcinogenesis in the guppy *Poecilia reticulata*, *Diseases of Aquatic Organisms,* 52:191-198 pp.

Froystad, M. K., Rode, M., Berg, T. and Gjoent, T., 1998, A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages, *Developmental and Comparative Immunology,* 22(5/6):533-549 pp.

Gallo, V. and Civinini, A., 2003, Survey of the adrenal homolog in teleosts, *International Review of Cytology,* 230:89-187 pp.

Gallo, V. and Civinini, A., 2005, The development of adrenal homolog of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: an immunohistochemical and ultrastructural study, *Anatomy and Embryology,* 209:233-242 pp.

Gangopadhyay, K. and Sumit Homechaudhuri, S., 2011, Descriptive characteristics of haemopoietic cell lineages in afacultative air breathing fi sh *Clarias batrachus* (L.). *Turkish Journal of Zoology,* 35(5): 737-746 pp.

Garg, T. and Mittal, A., 1993, Observations on the function of mucous cells in the epidermis of the catfish *Clarias batrachus* exposed to sodium dodecyl sulfate, *Biomedical and Environmental Sciences,* 6:119-133 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gauthier, D. T., Rhodes, W. M., 2009, Mycobacteriosis in fishes: A review, *The Veterinary Journal* 180:33-47 pp.

Gerhard, G. S., 2007, Small laboratory fish as models for aging research, *Ageing Research Reviews,* 6:64-72 pp.

Ghisi, N.C., 2012, Relationship between biomarkers and pesticide exposure in fishes: a review, pesticides - advances in chemical and botanical pesticides, Dr. R.P. Soundararajan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0680-7, InTech, DOI: 10.5772/48604 pp.

Giari, L., Manera, M., Simoni, E. and Dezfuli, B. S., 2007, Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere,* 67:1171-1181 pp.

Grace, M. F. and Manning, M. J., 1980, Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich, 1836, *Developmental and Comparative Immunology.,* 4:255-264 pp.

Grassi Milano, E., Basari, F. and Chimenti, C., 1997, Adrenocortical and adrenomedullary homologs in eight species of adult and developing teleosts: morphology, histology, and immunohistochemistry, *General and Comparative Endocrinology,* 108(3):483-496 pp.

Gray, D. A. and Woulfe, J., 2005, Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. Science of Aging Knowledge Environment 2005 (5), re1.

Grøntvedt, R. N. and Espelid, S., 2003, Immunoglobulin producing cells in the chain isotypes in the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen), *Fish and Shellfish Immunology,* 15:311-323 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gundersen, D. T., Miller, R., Mischler, A., Elpers, K., and Mims, S. D., 2000, Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl and chlordane-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. *Environmental Toxicology Chemistry,* 19, 2275-2285 pp.

Güneş, E. and Sedat, Y. V., 2011, Effects of deltamethrin on lipase activity in guppies (*Poecilia reticulata*), *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences,* 11:473-476 pp.

Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K. and Crosier, P., 2007, The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish, *BMC Developmental Biology,* 7(42):1-17 pp.

Handy, R. D. and. Penrice, W. S., 1993. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Comparative Biochemistry and Physiology* (C), 106:717-724 pp.

Hansen, J. and Zapata, A., 1998, Lymphocyte development in fish and amphibians. *Annual Review of Immunology,* 166:199-220 pp.

Hansen, J. D. and Kaatari, S. L., 1995, The recombination activation gene 1 (RAG1) of rainbow trout (*Oncorhychus mykiss*): cloning, expression, and phlogenetic analysis, *Immunogenetics,* 42:188-195 pp.

Hawkins, W. E., Walker, W. W., Fournie, J. W., Manning, S. C. and Krol, R. M., 2003, Use of the japanese medaka (*Oryzias latipes*) and guppy (*Poecilia reticulata*) in carcinogenesis testing under national toxicology program protocols, *Toxicologic Pathology,* 31:88-91 pp.

Holland, C. M. and Lambris, J. D., 2002, The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology,* 12:399-420 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Homechaudhuri, S., 2001, A technique to evaluate the erythropoietic efficiency in fish, *Asian Fisheries Science,* 14:453-455 pp.

Hontela, A., Daniel, C., and Rasmussen, J. B., 1997, Structural and functional impairment of the hypothalamo–pituitary–interrenal axis in fish exposed to bleached Kraft Mill effluent in the St Maurice River, Quebec. *Ecotoxicology*, 6:1-12 pp. ´

Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P. and Wellby, I., 2001, Diseases of carp and other cyprinid fishes. Malden, Maryland: Blackwell Science Ltd./Fishing News Books, Oxford, 253p.

Hsu, H.-J., Lin, G. and Chung, B.-c., 2003, Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros:differential control by wt1 and ff1b, *Development,* 130:2107-2116 pp.

Hsu, K., Kanki, J. P. and Look, T. A., 2001, Zebrafish myelopoiesis and blood cell development, *Current Opinion in Hematology,* 81:245-251 pp.

Hued, A. C., Oberhofer, S. and Bistoni, M., 2012, Exposure to a commercial glyphosate formulation (roundup) alters normal gill and liver histology and affects male sexual activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes), *Archives of Environmental Contamination and Toxicology,* 62:107-117 pp.

Hunt, L. R. and Rice, C. D., 2008, Lymphoid tissue ontogeny in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*, *The Anatomical Record,* 291:1236-1245 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Huttenhuisa, H. B., Huisinga, M. O., Meulen, T., Oosterhouda, C. N., Sanchez, N. A., Taverne-Thiele, A. J., Stroband H. W. and Rombout, J. H., 2005, Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*), *Developmental and Comparative Immunology,* 29:1033-1047 pp.

Ishizeki, K., Nawa, T. Tachibana, T. Sakakura, Y., and Iida, S., 1984, Hemopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus. Cell and Tissue Research,* 235(2):419-426 pp.

Ivankovic, T. and Hrenovic, J., 2010, Surfactants in the environment, *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology,* 61:95-110 pp.

Ivanovski, O., Kulkeaw, K., Nakagawa, M., Sasaki, T., Mizuochi, C., Horio , Y., Ishitani, T. and Sugiyama, D., 2009, Characterization of kidney marrow in zebrafish (*Danio rerio*) by using a new surgical technique, *Contributions, Sec. Biol. Med. Sci., MASA,* 30(2):71-80 pp.

Jafarizadeh, M., Peyghan, R., Mohammadian, B., 2012, The reports of lesions in kidney and intestine of apparently normal cultured silver carp (*Hypophtalmictys molitrix*), *Advances in Bioscience and Biotechnology,* 3:115-120 pp.

Jasim, B. M., 2013, Structural changes in the kidney of *Barbus sharpeyi* (Cyprinidae) youngs adapted to brackishwater. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science,* 357-363 pp.

Jiraungkoorskul, W., Kosai, P., Sahaphong, S., Kirtputra, P., Chawlab, J. and Charucharoen, S., 2007, Evaluation of micronucleus test's sensitivity in freshwater fish species. *Research Journal of Environmental Sciences,* 1:56-63 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. and Matthiessen , P. S., 1996, Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 194-202 pp.

Josefsson, S. and Tatner, M. F., 1993, Histogenesis of the lymfoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.), *Fish & Selfish Immunology,* 3:35-49 pp.

Joshi, V. and Sawant, M., 2006, Study on dissolution rate enhancement of poorly water soluble drug: contributions of solubility enhancement and relatively low micelle diffusivity, *Journal of Dispersion Science and Technology,* 27:1141-1150 pp.

Joshi, V. Y., Kadam, M. M. and Sawant, M. R., 2007, Comparison of QSAR and QSPR based aquatic toxicity for mixed surfactants, *Journal of Surfactants and Detergents,* 10:25-34 pp.

Kent, M. L., Feist, S. W., Harper, C., Hoogstraten-Miller, S., Law, M. J., Sánchez-Morgado, J. M., Tanguay, R. L., Sanders, G. E., Spitsbergen, J. M. and Whipps, C. M., 2009, Recommendations for control of pathogens and infectious diseases in fish research facilities, *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology,* 149(2):240-248 pp.

Khoo, G., Lim, T. M., Chan, W.-K. and Phang, V. P., 1999, Genetic Basis of the Variegated Tail Pattern in the Guppy, *Poecilia reticulata*, *Zoological Science,* 16:431-437 pp.

Kinnberg, K., Korsgaard, B. and Bjerregaard, P., 2003, Effects of octylphenol and 17b-estradiol on the gonads of guppies (*Poecilia reticulata*) exposed as adults via the water or as embryos via the mother, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C,* 134:45-55 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kobayashia, I., Moritomo, T., Ototake, M. and Nakanishi, T., 2007, Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) kidney hematopoietic tissues, *Developmental and Comparative Immunology,* 31:696-707 pp.

Kobayashia, I., Sekiyaa, M., Moritomoa, T., Ototakeb, M., and Nakanishia, T., 2006, Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorfii*) kidney, *Developmental and Comparative Immunology,* 30:1034-1046 pp.

Kobelkowsky, A., 2013, Morphology and dissection technique of the kidney of the grey snapper *Lutjanus griseus* (Teleostei: Lutjanidae), *International Journal of Morphology.,* 31(2):553-561 pp.

Kondera, E. and Witeska, M., 2013, Cadmium and copper reduce hematopoietic potential in common carp (*Cyprinus carpio* L.) head kidney, *Fish Physiology and Biochemistry,* 39(4):755-764 pp.

Kondera, E., 2011, Haematopoiesis in the head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.): a morphological study, *Fish Physiology and Biochemistry,* 37:355-362 pp.

Könnecker, G., Regelmann, J., Belanger, S., Gamon, K. and Sedlak, R., 2011, Environmental properties and aquatic hazard assessment of anionic surfactants: physico-chemical, environmental fate and ecotoxicity properties, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 74:1445-1460 pp.

Kosai, P., Jiraungkoorskul, W., Synsatayakul A. and Jiraungkoorskul, K., 2011. Efficacy of calcium reducing lead toxicity in hematology of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science,* 6:346-355 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Koumans-van Diepen, J. C., Egberts, E., Peixoto, B. R., Taverne, N. and Rombout, J. H., 1995, B cell and immunoglobulin heterogeneity in carp (*Cyprinus carpio* L.); an immuno(cyto)chemical study, *Developmental and Comparative Immunology,* 19(1):97-108 pp.

Kowalska , I., Kabsch-Korbutowicz, M., Majewska-Nowak, K. and Winnicki, T., 2004, Separation of anionic surfactants on ultrafiltration membranes, *Desalination,* 162:33-40 pp.

Kum, C. and Sekkin, S., 2011, The Immune system drugs in fish: immune function, immunoassay, drugs, recent advances in fish farms, Dr. Faruk Aral (Ed.), Available from: http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-fish-farms/the-immune-system-drugs-in-fish-immune-function-immunoassay-drugs

Lam, S. H., Chua, H. L., Gong, Z., Lam, T. J. and Sin, Y. M., 2004, Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study, *Developmental and Comparative Immunology,* 28:9-28 pp.

Landsberg, J. H., Paperna, I., 1992, Systemic granuloma in goldfish caused by a *Dermocystidium* like etiological agent, *Diseases of Aquatic Organisms,* 13:75-78 pp.

Law, M. J., 2003, Issues related to the use of fish models in toxicologic pathology: session introduction, *Toxicologic Pathology,* 31:49-52 pp.

Lieschke, G. J., Oates, A. C., Crowhurst, M. O., Ward, A. C. and Layton, J. E., 2001, Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish, *Blood,* 98:3087-3096 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Liu, Y., Zhang, S., Jiang, G., Yang, D., Lian, J. and Yang, Y., 2004, The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus,* from hatching to 13 months, *Fish and Shellfish Immunology,* 16:621-632 pp.

Luco, D. F., Peribanez, M. A., Garcia, L., Castillo, J. A., 1997, Granulomatous myositis in rainbow trout Oncorhynchus mykiss affected by proliferative kidney disease (PKD), *Diseases of Aquatic Organisms,* 31:49-54 pp.

Magnadottir, B., 2006, Innate immunity of fish (overview), *Fish and Shellfish Immunology,* 20:137-151 pp.

Mela, M., Randia, M., Venturab, D., Carvalho, C., Pelletierd, E. and Ribeiro, O. C., 2007, Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus, Ecotoxicology and Environmental Safety,* 68:426-435 pp.

Meloni, S. and Scapigliati, G., 2000, Evaluation of immunoglobulins produced in vitro by head-kidney leucocytes of sea bass Dicentrarchus labrax by immunoenzymatic assay, *Fish and Shellfish Immunology,* 10:95-99 pp.

Meseguer, J., Esteban, M. and Aqulleiro, B., 1991, Stromal cells, macrophages and lymphoid cells in the head-kidney of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). An ultrastructural study, *Archives of Histology and Cytology,* 54(3):299-309 pp.

Meseguer, J., Esteban, M., Garcia, A. and Lopez, R., 1990, Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): an ultrastructural study, *Archives of Histology and Cytology,* 53(3):287-296 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mittal, A. and Garg, T., 1994, Effect of an anionic detergen sodium dodecyl sulphate exposure on club cells in the epidermis of *Clarias batrachus, Journal of Fish Biology,* 44:857-875 pp.

Mohanty, B. R. and Sahoo, P. K., 2010, Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection, *Fish and Shellfish Immunology,* 28:613-621 pp.

Mueller, G. and Kim, U., 1978, Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols, *Endocrinology,* 102:1429-1435 pp.

Muiswinkel, W. B. and Nakao, M., 2014, A short history of research on immunity to infectious diseases in fish, *Developmental and Comparative Immunology,* 43:130-150 pp.

Mukerjee, P. and Yang, A. Y. S., 1976, Nonideality of mixing of micelles of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants and evidence of partial miscibility from differential conductance data, *The Journal of Physical Chemistry,* 80(12):1388-1390 pp.

Nakajima, M. and Taniguchi, N., 2001, Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture, *Genetica,* 111:279-289 pp.

Norris, D. O., Felt, S. B., Woodling, J. D., and Dores, R. M., 1997, Immunocytochemical and histological differences in the interrenal axis of feral brown trout, *Salmo trutta*, in metal-contaminated waters. *General and Comparative Endocrinology,* 108:343-353 pp.

Novotny, L., Halouzka, R., Matlova, L., Vavra, O., Bartosova, L., Slany, M. and Pavlik, I., 2010, Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria, *Journal of Fish Diseases,* 33:947-955 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

O'Neill, J. B. 1989, Ontogeny of the lymphoid organs in an antarctic teleost *Harpagifer antarcticus* (Nototheniodidei: Peciformes), *Developmental and Comparative Immunology,* 13:25-33 pp.

Pacheco, M. and Santos, M. A., 2002. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 53:331-347 pp.

Padros, F. and Crespo, S., 1996, Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus:* a light and electron microscope study, *Aquaculture,* 144:1-16 pp.

Pankhurst, N. W., 2011, The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology,* 15;170(2):265-75 pp.

Park, K. and Heo, G.-J., 2009, Acute and subacute toxicity of copper sulfate pentahydrate ($Cu_{SO4}5 \cdot H_2O$) in the guppy (*Poecilia reticulata*), *Journal of Veterinary Medical Science,* 71(3):333-336 pp.

Patel, S., Sørhus, E., Fiksdal, I. U. and Espedal, P. G., 2009, Ontogeny of lymphoid organs and development of IgM-bearing cells in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.), *Fish and Shellfish Immunology,* 26:385-395 pp.

Pedersen, S., Christiansen, L., Pedersen, K., Korsgaard, B. and Bjerregaard, P., 1999, In vivo estrogenic activity of branched and linear alkylphenols in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Science of the Total Environment,* 233:89-96 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Perry, S. F. and Capaldo, A., 2011, The autonomic nervous system and chromaffin tissue: neuroendocrine regulation of catecholamine secretion in non-mammalian vertebrates, *Autonomic Neuroscience.,* 16(165/1):54-66 pp.

Peterman, A. E. and Petrie-Hanson, L., 2006, Ontogeny of American paddlefish lymphoid tissues, *Journal of Fish Biology,* 69:72-88 pp.

Peters, G. and Schwarzer, R., 1985, Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress, *Diseases of Aquatic Organisms,* 1:1-10 pp.

Petri-Hanson, L. and Ainsworth, A. J., 2001, Ontogeny of channel catffih lymfoid organs, *Veterinary Immunology and Immunupathology,* 81:113-127 pp.

Pohla-Gubo , G. and Adam, H., 1982, Der einfluβ des anionaktiven epidermis juveniler Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* Richardson), *Zoologischer Anzeiger,* 209:97-110 pp.

Press, C. M. and Evensen, O., 1999, The morphology of the immune system in teleost fishes, *Fish and Shellfish Immunology,* 9:309-318 pp.

Qian, F., Zhen, F., Xu, J., Huang, M., Li, W., and Wen, Z., 2007, Distinct functions for different scl isoforms in zebrafish primitive and definitive hematopoiesis, *PLoS Biology,* 5(5): e132 pp.

Quabius, E .S., Nolan, D. T., Alinn, C. J., and Wendelaar Bonga, S.E., 2000, Influence of dietary exposure to polychlorinated biphenyl 126 and nutritional state on stress response in tilapia (*Oreochromus mossambicus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental *Toxicology and Chemistry,* 19:2892-2899 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Quentel, C. and Obcach, A., 1992, The cellular composition of the blood and haematopoietic organs of turbot *Scophthalmus maximus* L, *Journal of Fish Biology,* 41:709-716 pp.

Qureshi, T. and Sultan, R., 1976, Thyroid follicles in the head-kidney of teleosts. *Anatomischer Anzeiger,* 139(4):332-336 pp.

Raida, M. and Buchmann, K., 2008, Development of adaptive immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) surviving an infection with *Yersinia ruckeri*, *Fish and Shellfish Immunology,* 25:533-541 pp.

Raida, M. and Buchmann, K., 2009, Innate immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against primary and secondary infections with *Yersinia ruckeri* O1, *Developmental and Comparative Immunology,* 33:35-45 pp.

Reimschuessel, R., 2001, A fish model of renal regeneration and development. *ILAR Journal.,* 42(4):285-291 pp.

Reyes-Becerril, M., López-Medina, T., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M. Á., 2011, Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila, Fish and Shellfish Immunology,* 31:564-570 pp.

Reznick, D., Buckwalter, Buckwalter, G., Groff, J. and Elder, D., 2001, The Evolution of senescence in natural populations of guppies (*Poecila reticulata*): a comparative approach, *Experimental Gerontology,* 36:791-812 pp.

Ribelles, A., Carrasco, C. and Rosety, M., 1995a, Morphological and histochemical changes caused by sodium dodecyl sulphate in the gills of guiltheads (*Sparus aurata,* L), *European Journal of Histochemistry,* 39:141-148 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ribelles, A., Carrasco, C., Rosety, M. and Aldana , M., 1995c, Morphological and histochemical changes in the liver and pancreas of giltheads, *Sparus auratus* L., induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate, *Histology and Histopathology,* 10:781-787 pp.

Ribelles, A., Carrasco, M. C., Rosety, M. and Aldana, M., 1995b, Histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulfate on the intestine of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 32:131-138 pp.

Rocha, A., Gomes, V., Ngan, P., Passos , M. and Furia, R., 2007, Effects of anionic surfactant and salinity on the bioenergetics of juveniles of *Centropomus parallelus* (Poey), *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 4:397-404 pp.

Rodríguez, I., Novoa, B. and Figueras , A., 2008, Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila, Fish and Shellfish Immunology,* 25:239-249 pp.

Romano, N., 1998, Ontogeny of the immune system of fish using specific markers, Ph. D. Thesis, Wageningen University & Research Centre, Wageningen, 168p pp.

Romano, N., Abelli, L., Mastrolia, L. and Scapigliati, G., 1997, Immunocytochemical detection and cytomorphology of lymphocyte subpopulations in a teleost fish *Dicentrarchus labrax, Cell and Tissue Research,* 289:163-171 pp.

Romano, N., Ceccariglia, S., Mastrolia, L. and Mazzini, M., 2002, Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channicthyidae), *Tissue and Cell,* 34:63-72 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Romano, N., Picchietti, S., Taverne-Thiele, J., Taverne, N., Abelli, L., Mastrolia, L., Verburg-van Kemenade, B. M. and Rombout, J., 1998, Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio,* L.), *Anatomy and Embryology,* 198:31-41 pp.

Rosas, C., Espina, S., Diaz, F., Curts, J. and Rosas, I., 1988, Effect of sublethal detergent concentration upon gill permeability of *Ctenopharyngodon idella* (Pisces; Cyprinidae), *Water, Air, and Soil Pollution,* 24(3/4):253-258 pp.

Rosety, M., Ordóñez, F., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, l. Rosety, C. Carrasco and A. Ribell, J., Rosety, l., Carrasco, C. and Ribell, A., 2001, Acute toxicity of anionic surfactants sodium dodecyl sulphate (SDS) and linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the fertilizing capability of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm, *Histology and Histopathology,* 16:839-843 pp.

Rosety, M., Ribelles, A. and Carrasco, C., 1997, A morphological study in the kidney and spleen of gilthead, *Sparus aurata*, L. caused by sodium dodecyl sulphate. *Histology and Histopathology,* 12:925-929 pp.

Rosety-Rodríguez, M., Ordoñez, F., Roldan, S., Rosety, J., Rosety, M., Ribelles, A., Carrasco, C. and Rosety, I., 2002, Acute effects of sodium dodecyl sulphate on the survival and on morpho-histochemical characteristics of the trunk kidney of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L. *European Journal of Histochemistry,* 46:179-184 pp.

Roy, D., 1988, Statistical analysis of anionic detergent induced changes in the goblet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae: Pisces), *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 15:260-271 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Roy, U. S., Aich, A., Chattopadhyay, B., Datta, S. and Mukhopadhya, S. K., 2013, Studies on the toxicity of composite tannery effluent using guppy (*Poecilia reticulata*) as a a fish model, *Environmental Engineering and Management Journal,* 12(3):557-563 pp.

Russo, R., Yanong, R. and Terrel, S., 2007, Preliminary morphometrics of spleen and kidney macrophage aggregates in clinically normal blue gourami *Trichogaster trichopterus* and freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*, *Journal of Aquatic Animal Health,* 19:60-67 pp.

Salinas, I., Zhang, Y.-A. and Sunyer, J., 2011, Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish, *Developmental and Comparative Immunology,* 35:1346-1365 pp.

Sampour, M., 2008, The study of adrenal chromaffin of fish, *Carassius auratus* (Teleostei). *Pakistan Journal of Biological Science* 1;11(7):1032-1036 pp.

Santos, N. M., Romano, N., Sousa, M., Ellis, A. E. and Rombout, J. H., 2000, Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax,* L.), *Fish and Shellfish Immunology,* 10:583-596 pp.

Scapigliati, G., Romano, N. and Abelli, L., 1999, Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes, *Aquaculture,* 172:3-28 pp.

Scharsack, J. P., Steinhagena, D., Kleczka, C., Schmidt, J. O., Körting, W., Michael, R. D., Leibold, W. and Schuberth, H. J., 2003, Head kidney neutrophils of carp (*Cyprinus carpio* L.) are functionally modulated by the haemoflagellate *Trypanoplasma borreli*, *Fish and Shellfish Immunology,* 14:389-403 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Schroder, M. B., Villena, A. J. and Jorgensen, T., 1998, Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobuln producing cells in atlantic cod (*Gadus morhua* L.), *Developmental and Comparative Immunology,* 22(5/6):507-517 pp.

Shaddock, P., 2009, The see-thru guppy: a transparent fish model. *AACL Bioflux,* 2(2):137-145 pp.

Sharbidre, A. A., Metkari, V. and Patode, P., 2011, Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata, Pesticide Biochemistry and Physiology,* 101:132-141 pp.

Shuhaimi-Othman, M., Nadzifah, Y. and Ahmad, A., 2010, Toxicity of copper and cadmium to freshwater fishes, *World Academy of Science, Engineering and Technology,* 65:869-871 pp.

Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N.-A. and Abas, A., 2013, Comparative toxicity of eight metals on freshwater fish, *Toxicology and Industrial Health*, 1-10 pp.

Sigoillot, J. and Nguyen, M., 1992, Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater, *Applied and Environmental Microbiology,* 58(4):1308-1312 pp.

Silva, A. G. and Martinez, B. R. C., 2007, Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream, *Environmental Toxicology and Pharmacology*., 23:185-192 pp.

Song, H. D., Sun, X. J., Deng, M., Zhang, G. W., Zhou, Y., Wu, X. Y., Sheng, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Jiang, C. L., Fan, H. Y., Zon, L. I., Kanki, J. P., Liu, T. X., Look, A. T. and Chen, Z., 2004, Hematopoietic gene expression profile in zebrafish kidney marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 101(46):16240-16245 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Soto, A., Justicia, H., Wray, J. and Sonnenschein, C., 1991, p-nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from ‘‘modified’’ polystyrene. *Environmental Health Perspectives,* 92:167-73 pp.

Soza-Ried, C., Hess, I., Netuschil, N., Schorpp, M. and Boehm, T., 2010, Essential role of c-myb in definitive hematopoiesis is evolutionarily conserved, *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 107(40):17304-17308 pp.

Stenvika, J., Schrùdera, M., Olsena, K., Zapata, A. and Jùrgensen, T., 2001, Expression of immunoglobulin heavy chain transcripts (VH-families, IgM, and IgD) in head kidney and spleen of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), *Developmental and Comparative Immunology,* 25:291-302 pp.

Sunyer, J., 2012, Evolutionary and functional relationships of b cells from fish and mammals: insights into their novel roles in phagocytosis and presentation of particulate antigen, *Infectious Disorders Drug Targets,* 12(3):200-212 pp.

Thophon, S., Kruatrachuea, M., Upathama, E. S., P. Pokethitiyooka, P., S. Sahaphong, S., Jaritkhuan, S., 2003, Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer,* in acute and subchronic cadmium exposure, *Environmental Pollution* 121:307-320 pp.

Tian, J., Xie, H., Zhang, Y., Xu, Z., Yao, W. and Nie, P., 2009, Ontogeny of IgM-producing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by in situ hybridisation, *Veterinary Immunology and Immunopathology,* 132:146-152 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tokuda, Y., Toyohara, H., Ikemoto, M., Kina , T. and Sakaguchi, M., 2000, Distribution of immunoglobulin-positive cells in the spleen and kidney of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus, Fisheries Science,* 66:1082-1086 pp.

Tort, L., Balasch, J. and Mackenzie, S., 2003, Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses, *Inmunología,* 22(3):277-286 pp.

Toussaint, M. W., Rosencrance, A. B., Brennan, L. M., Dennis, W. E., Beaman, J. R., Wolfe, M. J., Hoffmann, F. J. and Gardner, H. S., 2001, Chronic toxicity of bromodichloromethane to the japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Toxicologic Pathology,* 29:662-669 pp.

Travares-Dias, M., 2006, A morphological and cytochemical study of erythrocytes, thrombocytes and leukocytes in four freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology,* 68:1822-1833 pp.

Traver, D., Herbomel, P., Patton, E. E., Murphey, R. D., Yoder, J. A., Litman, G. W., Catic, A., Amemiya, C. T., Zon, L. I. and Trede, N. S., 2003, The zebrafish as a model organism to study development of the immun system. *Advance in Immunology,* 81:253-329 pp.

Troncoso, I. C., Cazenave, J., Bacchetta, C. and Bistoni, M., 2012, Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina), *Fish Physiology and Biochemistry,* 38:693-702 pp.

Tupker, R. A., Willis, C., Berardesca, E., Lee, C. H., Fartasch, M., Agner, T. and Serup, J., 1997, Guidelines on sodium laurly sulfate (SLS) exposure test, *Contact Dermatitis,* 37:53-69 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

UNEP/WHO. (1996). Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by anionic detergents. MAP Technical Reports Series, 110 pp.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. and Moran, G., 2011, Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review, *Veterinarni Medicina,* 56(10):486-503 pp.

Van Der Ven, L. T., Wester, P. W. and Vos, J. G., 2003, Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology and Chemistry,* 22(4):908-913 pp.

Veiga, M. L., Rodrigues, E. L. Pacheco, F. J. and Ranzani- Paiva, M. J. T., 2002. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus,* 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of Trichlorfon exposure. *Brazilian Archives of Biology and Technology,* 45: 171-175 pp.

Wang, R.-L., Bencic, D., Biales, A., Lattier, D., Kostich, M., Villeneuve, D., Ankley, G. T., Lazorchak, J. and Toth, G., 2008, DNA miccoarray-based ecotoxicological biomarker discovery in a small fish model species, *Environmental Toxicology and Chemistry,* 27(3):664-675 pp.

Watts, M., Kato, K., Munday, B. L. and Burke, C. M., 2003, Ontogeny of immun system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis,* Temminck and Schlegel 1844), *Aquaculture Research,* 34:13-21 pp.

Wester, P. and Canton, H. H., 1992, Histopathological effects in *Poecilia reticulata* (Guppy) exposed to methyl mercury chloride, *Toxicological Pathology,* 20(1):81-92 pp.

Wester, P. and Canton, J., 1987, Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) and din butyltindichloride (DBTC). *Aquatic Toxicology,* 10:143-165 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wester, P. W., Anton, J. H., van Iersel, A. A., Krajnc, E. and Vaessen, H., 1990, The toxicity of bis(trinbutyltin)oxide (TBTO) and di-n-butyltindichloride (DBTC) in small fish species *Oryzias latipes* (Medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy), *Aquatic Toxicology,* 16:53-72 pp.

Wester, P. W., Van Der Ven, L. T. and Vos, J. G., 2004, Comparative toxicological pathology in mammals and fish: some examples with endocrine disruptors, *Toxicology,* 205:27-32 pp.

Wester, P., Canton, J. and Dormans, J., 1988, Pathological effects in freshwater fish *Poecilia reticulata* (guppy) and *Oryzias latipes* (medaka) following methyl bromide and sodium bromide exposure, *Aquatic Toxicology,* 12:323-344 pp.

Wester, P., Canton, J. H., and Bisschop, A., 1985, Histopathological study of *Pooecilia reticulata* (guppy) after long-term β-hexachlorocyclohexane exposure, *Aquatic Toxicology,* 6:271-296 pp.

Wester, P., Van Der Ven, L., Vethaak, A., Grinwis, G. and Vos, J., 2002, Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology, *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 11:289-295 pp.

Willett, C. E., Cortes, A., Zuasti, A. and Zapata, A. G., 1999, Early hematopoiesis and developing lymphoid organs in the zebrafish, *Developmental Dynamics,* 214:323-336 pp.

Wlasow, T. and Dabrowska, H., 1989, Cellular changes in the blood and haemopoietic tissues of common carp exposed to sublethal concentration of ammonia, *Aquatic Living Resources,* 2:169-174 pp.

Wolf, J. C. and Wolfe , M. J., 2005, A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish, *Toxicologic Pathology,* 33:75-85 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Woodhead, A., Setlow, R. and Hart, R., 1977, Tissue changes resulting from the injection of y-lrradiated cells into the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa, Cancer Research,* 37:4261-4266 pp.

Ying, G.-G., 2006, Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment, *Environment International,* 32:417-431 pp.

Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Frias, C.-d. and Cortes, A., ,2006, Ontogeny of the immune system of fish, *Fish and Shellfish Immunology,* 20:126-136 pp.

Zeni, C. and Caligiuri, A., 1992, Morphological and ultrastructural changes induced by sublethal concentrations of an anionic detergent of *Ictalurus* species barbel taste buds, *Microbios,* 69:41-52 pp.

Zeni, C. and Stagni, A., 2002, Changes in the olfactory mucosa of the black bullhead *Ictalurus melas* induced by exposure to sublethal concentrations of sodium dodecylbenzene sulphonate, *Diseases of Aquatic Organisms,* 51:37-47 pp.

Zeni, C., Caligiuri, S. A. and Bovolenta, M., 1995, Damage and recovery of *Ictalurus sp.* barbel taste buds exposed to sublethal concentrations of an anionic detergent, *Aquatic Toxicology (Amsterdam),* 31:113-123 pp.

Zuasti, A. and Ferrer, C., 1989, Haemopoiesis in the head kidney of *Sparus auratus*, *Archives of Histology and Cytology,* 52:249-255 pp.

Zwollo, P., 2011, Dissecting teleost B cell differentiation using transcription factors, *Developmental and Comparative Immunology,* 35:898-905 pp.

Zwollo, P., Cole, S., Bromage, E. and Kaattari, S., 2005, B cell heterogeneity in the teleost kidney: evidence for a maturation gradient from anterior to posterior kidney, *The Journal of Immunology,* 174:6608-6616 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Tülin ÇETİN 11.03.1980 tarihinde Balıkesir'de doğudu. İlk, orta ve lise öğrenimini Balıkesir'de tamamladı. 1998 yılında girdiği Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünden 2003 yılında mezun oldu. 2003-2006 yılları arasında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitiüsünden yüksek lisans öğrenimini tamamladı. 2006 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitütüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Bilim Dalında doktora öğrenimini sürdürmektedir.

Katıldığım Kurslar ve Bilimsel Topllantılar

- Ulusal Sinirbilim Öğrenci Kongresi, 2002, Ege Üniversitesi-İzmir/Türkiye
- Protein Techniques and Proteomics, 21-25 Haziran 2004, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü EBİLTEM-İzmir/Türkiye.
- IV. Ulusal Mantık, Matematik ve Felsefe Sempozyumu, (Konu: Bilim ve Sanat) 16-19 Eylül 2007, Foça- İzmir/Türkiye.
- 6th Symposium on the Lacertids of the Mediterranean Basin, 23-27 June 2008, Lesvos, Greece.
- V. Ulusal Mantık, Matematik ve Felsefe Sempozyumu, (Konu: Evrim) 11-14 Eylül 2008, Foça- İzmir/Türkiye.
- 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir/Türkiye
- Matematiksel Evrim Yazokulu, 9-15 Eylül 2013, Matematik Köyü Şirince- İzmir/Türkiye.
- 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2014, Eskişehir/Türkiye.
- Ecology and Evolutionary Biology Symposium, 6-7 Ağustos 2015, ODTU- Ankara/Türkiye.

Uluslararası Science Citation Index Tarafından Taranan Dergilerde Yayınlanmış Makaleler

- 'First Record of Mesocestoides spp. Vaillant, 1863 Tetrathyridia (Cestoidea: Cyclophyllidea) in Anatolian lizard, Anatololacerta danfordi (Günther, 1876) in Turkey', Gözde GÜRELLİ, Bayram GÖÇMEN, Tülin ÇETİN-DOGAN and Nursen ALPAGUT-KESKİN, 2007, North-Western Journal of Zoology, Vol. 3, No. 2, pp.96-104.