T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİNEER ALKİL BENZEN SÜLFONİK ASİTİN ZEBRA BALIKLARINDA EMBRİYONİK KÖK HÜCREDEN GONAD GELİŞİMİNE KADAR OLAN TOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Cansu AKBULUT

Enstitü Anabilim Dalı : **BİYOLOJİ**

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ**

Ocak 2018

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LİNEER ALKİL BENZEN SÜLFONİK ASİTİN ZEBRA BALIKLARINDA EMBRİYONİK KÖK HÜCREDEN GONAD GELİŞİMİNE KADAR OLAN TOKSİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Cansu AKBULUT

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 25 / 01 /2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr.
Figen Esin KAYHAN
Jüri Başkanı

Doç. Dr.
Nazan Deniz YON ERTUĞ
Üye

Doç. Dr.
Hüseyin AKSOY
Üye

Doç. Dr.
Sibel ÇOLAK
Üye

Yrd. Doç. Dr.
Ali DOĞRU
Üye

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Cansu AKBULUT

29/12/2017

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca beni yönlendiren ve hiç bir şekilde yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Nazan Deniz YÖN ERTUĞ başta olmak üzere, fikirleriyle tez çalışmamı yönlendiren ve tezime katkıda bulunan değerli hocalarım Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN ve Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Tarık DİNÇ, Dr. Güllü KAYMAK ve Büşra FİDAN'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, lisansüstü eğitim sürecinde manevi açıdan desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım Arş. Gör. Sezen TOKSOY KÖSEOĞLU'na ve tüm mesai arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora eğitimimi 2211/E Doğrudan Yurtiçi Doktora Burs Programı ile destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'e ve tez çalışmamı maddi açıdan destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu'na (Proje No: 2015-50-02-006) teşekkür ederim.

Başta Gültuğ GÜVENİR olmak üzere, eğitim hayatım boyunca hiçbir şekilde desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan ailemin her ferdine en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ……..... i
İÇİNDEKİLER ……..... ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ ……..... v
ŞEKİLLER LİSTESİ ……..... vi
TABLOLAR LİSTESİ …….. xxii
ÖZET ……. xxiii
SUMMARY …….. xxiv

BÖLÜM 1.
GİRİŞ ……..... 1

BÖLÜM 2.
GENEL BİLGİLER…….……..... 2
2.1. Deterjanlar……..…….. 2
2.1.1. Yüzey aktif madde……. 4
2.1.1.1. Lineer alkil benzen sülfonik asit ……..…..... 5
2.2. Zebra Balığı……..…..……..... 7
2.2.1. Zebra balığı ile ilgili genel bilgiler……. 7
2.2.2. Zebra balığının model organizma olarak kullanimi…..…..... 8
2.2.3. Zebra balığının gelişim aşamalari……..……... 8
2.3. Kök Hücre…… 12
2.3.1. Primordiyal germ hücresi…… 15
2.3.1.1. Primordiyal germ hücrelerinin morfolojik ve histolojik özellikleri……..……..……. 15
2.3.1.2. Primordiyal germ hücrelerinin göç mekanizmasi… 16
2.4. Zebra Balığında Gonad Oluşumu……. 20

2.5. Apoptoz……. 23
2.6. Oksidatif Stres…… 27
2.7. Lipid Peroksidasyonu …… 30
2.8. Asetilkolinesteraz…… 30

BÖLÜM 3.
MATERYAL VE YÖNTEM ……..……..…… 32
3.1. Materyal ……..….. 32
3.1.1. Lineer alkil benzene sülfonik asit……. 32
3.1.2. Zebra balığı embriyo eldesi…….. 32
3.2. Yöntem ……..... 33
3.2.1. LC_{50} değerinin belirlenmesi ……..... 33
3.2.2. Toksisite analizleri…….……..... 33
3.2.3. Histolojik analizler…… 33
3.2.3.1. Fiksasyon 33
3.2.3.2. Dehidrasyon 34
3.2.3.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme 34
3.2.3.4. Kesit alma 34
3.2.3.5. Histolojik boyamalar 35
3.2.4. Akridin turuncusu boyaması……. 38
3.2.5. TUNEL yöntemi…….…….. 38
3.2.6. Biyokimyasal analizler…….……. 39
3.2.6.1. %10'luk embriyo homojenatının hazırlanması…. 39
3.2.6.2. Toplam protein miktarının belirlenmesi….…… 39
3.2.6.3. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi…. 40
3.2.6.4. İndirgenmiş glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesi…….……..… 41
3.2.6.5. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi.…….. 42
3.2.6.6. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi…… 42
3.2.7. İstatistiksel analizler…….……. 43

BÖLÜM 4.

ARAŞTIRMA BULGULARI …….. 44

4.1. LC_{50} Değerinin Hesaplanmasi …….. 44

4.2. Gelişim Toksisitesi Analizleri……..…….. 44

4.3. Akridin Turuncusu Boyaması…….……... 48

4.4. TUNEL Analizi…….…… 49

4.5. Biyokimyasal Analizler…….…… 51

4.5.1. Toplam protein miktarı…….…… 51

4.5.2. Lipid peroksidasyonu…… 52

4.5.3. İndirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı……..…… 52

4.5.4. Katalaz (CAT) aktivitesi…..…….…… 53

4.5.5. Asetilkolinesteraz aktivitesi…..…..……... 53

4.6. Histolojik Analizler……. 54

4.6.1. Kontrol grubu…….…….. 54

4.6.2. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup…..…… 90

4.6.3. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup …….…….. 125

4.6.4. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup ….……. 159

BÖLÜM 5.

TARTIŞMA VE SONUÇ ……..... 192

KAYNAKLAR ……. 201

ÖZGEÇMİŞ ……... 219

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
CAT	: Katalaz
Cl	: Klor
dk	: Dakika
EtOH	: Etil alkol
g	: Gram
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GST	: Glutatyon S- transferaz
K	: Potasyum
L	: Litre
LAS	: Lineer alkil benzen sülfonik asit
LC_{50}	: Letal konsantrasyon 50
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
Na	: Sodyum
ºC	: Santigrat derece
PGH	: Primordiyal germ hücresi
ROT	: Reaktif oksijen türleri
sn	: Saniye
SOD	: Süperoksit dismutaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. 12 C'lu lineer alkil benzen sülfonik asitin kimyasal yapısı……. 5
Şekil 2.2. Erkek ve dişi zebra balığı……... 7
Şekil 2.3. Zebra balığı gelişiminde zigot evresi……. 9
Şekil 2.4. Zebra balığı gelişiminde segmentasyon evresi…….. 9
Şekil 2.5. Zebra balığı gelişiminde blastula evresi…… 10
Şekil 2.6. Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon evresi……. 11
Şekil 2.7. Zebra balığı gelişimi, somit oluşumu…… 11
Şekil 2.8. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması……. 14
Şekil 2.9. Elde edildiği kaynaklara göre kök hücrelerin sınıflandırılması…….. 15
Şekil 2.10. Primordiyal germ hücrelerinin ilk 24 saat içerisindeki göç yolu…..... 18
Şekil 2.11. Hücre içi ve hücre dışından gelen ölüm aktivatörleri ile oluşan apoptoz mekanizması……..…… 26
Şekil 2.12. Hücrede oksidatif hasar oluşumu……. 27
Şekil 3.1. Embriyoların homojenize edilmesi…… 39
Şekil 4.1. LAS uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarında ölüm oranları... 45
Şekil 4.2. LAS uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarında koryondan çıkma oranı …….. 45
Şekil 4.3. LAS uygulaması sonucunda zebra balığı embriyolarında görülen anomali oranı ……... 46
Şekil 4.4. Kontrol ve doz grubuna ait zebra balığı embriyolarında görülen anomaliler…… 47
Şekil 4.5. 5 günlük LAS uygulaması sonucunda zebra balığı prelarvalarının boy uzunlukları ……... 48
Şekil 4.6. 24 saatlik zebra balığı embriyolarında akridin turuncusu boyaması… 49
Şekil 4.7. 24 saatlik zebra balığı embriyolarında TUNEL analizi……... 50

Şekil 4.8. Kontrol ve deney grubuna ait 24 saatlik zebra balığı embriyolarındaki apoptotik hücre sayıları…… 51
Şekil 4.9. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki total protein miktarı…….. 51
Şekil 4.10. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki MDA miktarı…… 52
Şekil 4.11. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki GSH miktarı…….....……. 53
Şekil 4.12. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki CAT miktarı…….……. 53
Şekil 4.13. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki AChE miktarı……..……... 54
Şekil 4.14. Kontrol grubu,1 günde görülen primordiyal germ hücresi…….. 55
Şekil 4.15. Kontrol grubu, 2. günde görülen primordiyal germ hücresi……. 55
Şekil 4.16. Kontrol grubu, 2. günde somitler ile vitellüs kesesi arasında bulunan primordiyal germ hücreleri…….. 56
Şekil 4.17. Kontrol grubu, 3. günde solungaç lamellerinde bulunan primordiyal germ hücresi……. 57
Şekil 4.18. Kontrol grubu, 3. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücreleri……... 57
Şekil 4.19. Kontrol grubu, 5. günde solungaç lamellerinde bulunan primordiyal germ hücresi……. 58
Şekil 4.20. Kontrol grubu, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 59
Şekil 4.21. Kontrol grubu, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 59
Şekil 4.22. Kontrol grubu, 5. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi…….. 60
Şekil 4.23. Kontrol grubu, 7. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücresi 60
Şekil 4.24. Kontrol grubu, 10. günde, karaciğer ve özofagusta bulunan primordiyal germ hücreleri…….. 61

Şekil 4.25. Kontrol grubu, 10. günde somitlerin kenarında bulunan primordiyal germ hücresi……. 62
Şekil 4.26. Kontrol grubu, 12. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri……... 62
Şekil 4.27. Kontrol grubu, 12. günde kalpte görülen primordiyal germ hücresi.. 63
Şekil 4.28. Kontrol grubu, 13. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri……... 63
Şekil 4.29. Kontrol grubu, 13. gün, gonadal bölge…… 64
Şekil 4.30. Kontrol grubu, 16. günde kalpte görülen primordiyal germ hücreleri. 65
Şekil 4.31. Kontrol grubu, 16. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri……... 65
Şekil 4.32. Kontrol grubu, 17. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri……... 66
Şekil 4.33. Kontrol grubu, 17. günde gonadal bölgeye göç eden primordiyal germ hücreleri……... 66
Şekil 4.34. Kontrol grubu, 19. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri……... 67
Şekil 4.35. Kontrol grubu, 19. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücresi……. 67
Şekil 4.36. Kontrol grubu, 19. gün, gonad yapısı…….. 68
Şekil 4.37. Kontrol grubu, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri 69
Şekil 4.38. Kontrol grubu, 25. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 69
Şekil 4.39. Kontrol grubu, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri……... 70
Şekil 4.40. Kontrol grubu, 25. gün, gonad yapısı…….. 70
Şekil 4.41. Kontrol grubu, 29. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi 71
Şekil 4.42. Kontrol grubu, 29. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi……... 71
Şekil 4.43. Kontrol grubu, 29. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 72

Şekil 4.44. Kontrol grubu, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 72
Şekil 4.45. Kontrol grubu, 33. gün, kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri 73
Şekil 4.46. Kontrol grubu, 33. gün, solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 74
Şekil 4.47. Kontrol grubu, 33. gün, karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 74
Şekil 4.48. Kontrol grubu, 33. gün, ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 75
Şekil 4.49. Kontrol grubu, 33. gün, gonad yapısı…… 75
Şekil 4.50. Kontrol grubu, 33. gün, gonad yapısı…… 76
Şekil 4.51. Kontrol grubu, 37. gün, solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 77
Şekil 4.52. Kontrol grubu, 37. gün, özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 77
Şekil 4.53. Kontrol grubu, 37. gün, kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri... 78
Şekil 4.54. Kontrol grubu, 37. gün, ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 78
Şekil 4.55. Kontrol grubu, 37. günde gonad yapısı……. 79
Şekil 4.56. Kontrol grubu, 37. günde gonad yapısı……. 79
Şekil 4.57. Kontrol grubu, 42. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri…….. 80
Şekil 4.58. Kontrol grubu, 42. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…….. 81
Şekil 4.59. Kontrol grubu, 42. günde gonad yapısı……. 81
Şekil 4.60. Kontrol grubu, 42. günde gonad yapısı……. 82
Şekil 4.61. Kontrol grubu, 47. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri 83
Şekil 4.62. Kontrol grubu, 47. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 83
Şekil 4.63. Kontrol grubu, 47. günde gonad bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 84
Şekil 4.64. Kontrol grubu, 47. günde gonad yapısı…… 84

Şekil 4.65. Kontrol grubu, 52. günde solungaçlarda görülen primordiyal germ hücreleri…….. 85
Şekil 4.66. Kontrol grubu, 52. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…….. 85
Şekil 4.67. Kontrol grubu, 52. günde gonad yapısı…… 86
Şekil 4.68. Kontrol grubu, 52. günde gonad yapısı……. 86
Şekil 4.69. Kontrol grubu, 57. günde gonad bölgesinde görülen primordiyal germ hücreleri…….. 87
Şekil 4.70. Kontrol grubu, 57. günde gonad yapısı……. 87
Şekil 4.71. Kontrol grubu, 60. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 88
Şekil 4.72. Kontrol grubu, 60. günde karaciğer ile hava kesesi arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 88
Şekil 4.73. Kontrol grubu, 60. günde gonad yapısı……. 89
Şekil 4.74. Kontrol grubu, 60. günde gonad yapısı……. 89
Şekil 4.75. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 91
Şekil 4.76. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 91
Şekil 4.77. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….....……. 92
Şekil 4.78. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi…….. 93
Şekil 4.79. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi dorsalinde tespit edilen primordiyal germ hücresi……. 93
Şekil 4.80. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi ventralinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 94
Şekil 4.81. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi……. 94
Şekil 4.82. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 95

Şekil 4.83. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 95
Şekil 4.84. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi……. 96
Şekil 4.85. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi…… 97
Şekil 4.86. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 97
Şekil 4.87. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde somitler ile vitellüs kesesi arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 98
Şekil 4.88. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi……..…….. 98
Şekil 4.89. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 99
Şekil 4.90. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 99
Şekil 4.91. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi…….. 100
Şekil 4.92. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi…… 100
Şekil 4.93. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 101
Şekil 4.94. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 101
Şekil 4.95. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 102
Şekil 4.96. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 102
Şekil 4.97. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 103
Şekil 4.98. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 103

Şekil 4.99. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 104
Şekil 4.100. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 104
Şekil 4.101. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 105
Şekil 4.102. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kas tabakasında gözlenen primordiyal germ hücresi……. 105
Şekil 4.103. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 106
Şekil 4.104. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde beyinde görülen primordiyal germ hücresi…… 106
Şekil 4.105. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 107
Şekil 4.106. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 107
Şekil 4.107. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 108
Şekil 4.108. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 108
Şekil 4.109. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı 109
Şekil 4.110. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 110
Şekil 4.111. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri…… 110
Şekil 4.112. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde gonad yapısı 111
Şekil 4.113. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 112
Şekil 4.114. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde somitler ile böbrek arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 112
Şekil 4.115. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……..…… 113

Şekil 4.116. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 114
Şekil 4.117. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 114
Şekil 4.118. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 115
Şekil 4.119. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısı 115
Şekil 4.120. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 116
Şekil 4.121. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 116
Şekil 4.122. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 117
Şekil 4.123. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı 117
Şekil 4.124. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 118
Şekil 4.125. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 118
Şekil 4.126. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri…… 119
Şekil 4.127. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gonad yapısı 119
Şekil 4.128. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 120
Şekil 4.129. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri……... 120
Şekil 4.130. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 121
Şekil 4.131. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısı 121
Şekil 4.132. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…… 122
Şekil 4.133. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı 122

Şekil 4.134. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 123
Şekil 4.135. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 123
Şekil 4.136. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı 124
Şekil 4.137. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı 124
Şekil 4.138. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellüs kesesinin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi……... 125
Şekil 4.139. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 126
Şekil 4.140. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesinin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 126
Şekil 4.141. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesinin ventralinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 127
Şekil 4.142. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 127
Şekil 4.143. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde göz kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 128
Şekil 4.144. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde vitellus kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 129
Şekil 4.145. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde somitlerin kenarında gözlenen primordiyal germ hücresi…… 129
Şekil 4.146. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 130
Şekil 4.147. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 130
Şekil 4.148. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 131
Şekil 4.149. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde somitlerin kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 131
Şekil 4.150. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 132

Şekil 4.151. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 132
Şekil 4.152. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 133
Şekil 4.153. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 134
Şekil 4.154. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 134
Şekil 4.155. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 135
Şekil 4.156. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 135
Şekil 4.157. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 136
Şekil 4.158. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi……. 136
Şekil 4.159. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 137
Şekil 4.160. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…… 137
Şekil 4.161. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde özofagus ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 138
Şekil 4.162. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kas tabakasında görülen primordiyal germ hücresi…… 138
Şekil 4.163. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 139
Şekil 4.164. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 139
Şekil 4.165. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 140
Şekil 4.166. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde gonad taslağında görülen goniyal hücreler…… 140

Şekil 4.167. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kalpte görülen primordiyal germ hücresi……. 141
Şekil 4.168. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…… 141
Şekil 4.169. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kuyrukta görülen primordiyal germ hücreleri……. 142
Şekil 4.170. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde gonad yapısı 142
Şekil 4.171. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 143
Şekil 4.172. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 143
Şekil 4.173. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücres…….. 144
Şekil 4.174. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı. 144
Şekil 4.175. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 145
Şekil 4.176. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 145
Şekil 4.177. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 146
Şekil 4.178. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde kas tabakasında gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 146
Şekil 4.179. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gonad yapısı 147
Şekil 4.180. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kalp ve karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 148
Şekil 4.181. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 148
Şekil 4.182. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 149
Şekil 4.183. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreler…… 150

Şekil 4.184. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 150
Şekil 4.185. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 151
Şekil 4.186. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı. 151
Şekil 4.187. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 152
Şekil 4.188. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 152
Şekil 4.189. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde görülen gonad yapısı…… 153
Şekil 4.190. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde görülen gonad yapısı…… 153
Şekil 4.191. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde görülen gonad yapısı…… 154
Şekil 4.192. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısında görülen spermatositler……. 154
Şekil 4.193. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. 155
Şekil 4.194. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. 155
Şekil 4.195. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. 156
Şekil 4.196. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 157
Şekil 4.197. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 157
Şekil 4.198. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. 158
Şekil 4.199. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. 158
Şekil 4.200. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellus kesesi dorsalinde görülen primordiyal germ hücresi……. 159
Şekil 4.201. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde göz kenarında tespit edilen primordiyal germ hücresi…… 160
Şekil 4.202. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi…… 160

Şekil 4.203. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 161
Şekil 4.204. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde somitlerin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 161
Şekil 4.205. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücresi……. 162
Şekil 4.206. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi…… 162
Şekil 4.207. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 163
Şekil 4.208. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi…… 164
Şekil 4.209. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 164
Şekil 4.210. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi…… 165
Şekil 4.211. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri……... 165
Şekil 4.212. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde alt çenede gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 166
Şekil 4.213. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi…… 166
Şekil 4.214. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 167
Şekil 4.215. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 167
Şekil 4.216. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi……. 168
Şekil 4.217. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 168
Şekil 4.218. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 169

Şekil 4.219. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 169
Şekil 4.220. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri……. 170
Şekil 4.221. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 170
Şekil 4.222. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 171
Şekil 4.223. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi……. 171
Şekil 4.224. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 172
Şekil 4.225. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 172
Şekil 4.226. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri…….. 173
Şekil 4.227. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta tespit edilen primordiyal germ hücreleri……. 174
Şekil 4.228. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ventral yüzgeçte görülen primordiyal germ hücreleri……. 174
Şekil 4.229. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde alt çenede görülen primordiyal germ hücreleri…… 175
Şekil 4.230. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. gonad yapısı…….. 175
Şekil 4.231. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde karaciğerde görülen primordiyal germ hücreleri…… 176
Şekil 4.232. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kas tabakasında görülen primordiyal germ hücreleri…… 177
Şekil 4.233. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde böbrekte görülen primordiyal germ hücreleri…….. 177
Şekil 4.234. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı… 178
Şekil 4.235. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 178

Şekil 4.236. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 179
Şekil 4.237. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 179
Şekil 4.238. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 180
Şekil 4.239. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri…….. 180
Şekil 4.240. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri…….. 181
Şekil 4.241. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gonad yapısı… 181
Şekil 4.242. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri……. 182
Şekil 4.243. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gözde görülen primordiyal germ hücresi…… 182
Şekil 4.244. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısında görülen vakuolizasyon……. 183
Şekil 4.245. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısı… 183
Şekil 4.246. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri…… 184
Şekil 4.247. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…… 184
Şekil 4.248. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde pektoral yüzgeçte görülen primordiyal germ hücreleri……. 185
Şekil 4.249. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı… 185
Şekil 4.250. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri…… 186
Şekil 4.251. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri…… 186
Şekil 4.252. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gonad yapısı… 187
Şekil 4.253. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri……. 188

Şekil 4.254. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısı… 188
Şekil 4.255. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri…… 189
Şekil 4.256. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde karaciğerde görülen primordiyal germ hücreleri…… 189
Şekil 4.257. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı… 190
Şekil 4.258. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri……. 191
Şekil 4.259. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı… 191

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Yüzey aktif madde tipleri ve bunlara ait örnekler……. 4
Tablo 3.1. Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması…….. 34
Tablo 3.2. Dehidrasyon uygulaması……... 34
Tablo 3.3. Best Carmin boyasının hazırlanması……. 35
Tablo 3.4. Best Carmin boyama yöntemi…….. 35
Tablo 3.5. Toluidin blue boyasının hazırlanışı yöntemi……. 36
Tablo 3.6. Toluidin blue boyama yöntemi……. 36
Tablo 3.7. Periyodik asit solüsyonunun hazırlanışı…… 37
Tablo 3.8. Periyodik Asit Schiff boyama protokolü…….. 37
Tablo 3.9. Alkalin Fosfataz Boyama Yöntemi…….. 37
Tablo 3.10. Homojenat tamponunun hazırlanması……. 39
Tablo 3.11. Bradford yöntemine göre embriyolarda protein tayini…… 40
Tablo 3.12. Ledwozyw Yöntemi ile Embriyolarda MDA Yöntemi…….. 40
Tablo 3.13. GSH tayini için gerekli çözeltiler…… 41
Tablo 3.14. Beutler yöntemine göre GSH tayini…… 41
Tablo 3.15. CAT tayini için gerekli çözeltiler……... 42
Tablo 3.16. CAT tayini için çözeltilerin hazırlanışı…… 42
Tablo 3.17. AChE tayini için gerekli çözeltiler…….. 43
Tablo 3.18. Ellman yöntemine göre AChE tayini 43

ÖZET

Anahtar Kelimeler: LAS, zebra balığı, toksikoloji, embriyo, gonad

Son yıllarda dünyada deterjan kullanımı hızlı bir şekilde yayılmış ve artmıştır. Nüfusun hızlıca çoğalmasına bağlı olarak deterjan kullanımının artması ve su ortamındaki konsantrasyonunun oranın yükselmesi ekosistemde canlı yaşamını tehdit etmektedir. Bu çalışma kapsamında deterjanlarda anyonik yüzey aktif madde (sürfaktan) olarak kullanılan lineer alkil benzene sülfonik asit (LAS)'in zebra balığı embriyolarında oluşturduğu toksik etkiler histolojik ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir.

Yüksek rejenerasyon ve üreme kapasitesine sahip olan zebra balığı, gelişim biyolojisi çalışmalarında sıkça kullanılan omurgalı modelidir. Bu çalışma kapsamında çeşitli dozlarda LAS'ın (0,25 mg/L, 0,5 mg/L ve 1 mg/L), zebra balığı embiyolarına uygulandıktan sonra gelişime olan etkileri invert mikroskop ile tespit edilmiştir. LAS'ın embriyolarda hücre ölümü üzerine etkileri TUNEL tekniği ve Akridin turuncusu boyaması ile gözlenmiştir. 60 gün boyunca embriyolardan örnekler alınmış ve histolojik yöntemler kullanılarak LAS'ın zebra balığı gonad gelişimine etkisi araştırılmıştır. Zebra balığında primordiyal germ hücrelerinin konumları, göç yolu ve gonad taslaklarının yapısı PAS, Alkalin Fosfataz, Toluidine mavisi ve Best Carmin boyama yöntemleri uygulanarak yapılarak incelenmiştir. Buna ek olarak, LAS'ın embriyolarda oksidatif stress parametreleri üzerine olan etkileri MDA, GSH, AChE, CAT ve total protein ölçümleri yapılarak izlenmiştir. LAS uygulamasının zebra balığı embriyolarında apoptoza ve gelişim anomalilerine sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, primordiyal germ hücrelerinin göç yolundan ayrılmalarına neden olduğu, gonad gelişimini geciktirdiği ve gonad yapısında histopatolojik değişimlere sebep olduğu görülmüştür.

INVESTIGATION TOXICOLOGICAL EFFECTS OF LINEAR ALKYL BENZEN SULFONIC ACID FROM THE EMBRYONIC STEM CELL STAGE TO THE DEVELOPMENT OF GONADS IN ZEBRAFISH

SUMMARY

Keywords: LAS, zebrafish, toxicology, embryo, gonad

In recent years the use of detergents in the world has become widespread and growing rapidly. Rapid increase of population and use of detergent threatens the life of organisms in the ecosystem. In this study, toxic effects of linear alkyl benzene sulphonic acid (LAS), which is used as anionic surfactant in detergents, on zebrafish embryos were determined by using histological and biochemical methods.

Zebrafish, which has high regeneration and reproductive capacity, is a vertebrate model frequently used in developmental biology studies. In this study, probable toxic effects of various doses of LAS (0.25 mg/L, 0.5 mg/L and 1 mg/L) was investigated by invert microscopy in a developmental manner. The effects of LAS on cell death in zebrafish embryos were observed with TUNEL analysis and acridine orange staining. Samples were taken from embryos and larvae for 60 days and histological methods were used to investigate the effects of LAS on gonadal development. The locations and migration pathway of primordial germ cells and structure of the gonads in the zebrafish were examined by PAS, Alkaline Phosphatase, Toluidine blue and Best Carmin staining. In addition, the effects of LAS on embryonic oxidative stress parameters were monitored by measuring MDA, GSH, AChE, CAT and total protein. LAS exposure causes apoptosis and developmental anomalies in zebrafish embryos have been found. Besides, separation of primordial germ cells from the migration pathway, delay at gonadal development, and histopathological changes in the gonadal structure have been observed after LAS exposure.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Zebra balığı, gelişim biyolojisi çalışmalarında en çok kullanılan omurgalı modelinden biridir. Embriyo eldesinin kolay oluşu, bakımının ucuz ve basit olması, üreme döngüsünün çabuk tamamlanması, şeffaf embriyolara sahip oluşu ve embriyonun tüm gelişim aşamalarının mikroskop altında gözlenebilir olması sebebiyle çalışmalarda sıkça tercih edilmektedir.

Yüzey aktif maddeler, çözeltilerin yüzey gerilimini değiştirerek deterjanlara temizleme ve köpürme özelliği katan maddelerdir. Deterjan kullanımı günümüzde giderek artmaktadır. Deterjanların çevreye salınımı özellikle sucul ekosistemi tehdit etmektedir. Bu çalışma kapsamında yüzey aktif maddelerden biri olan lineer alkil benzen sülfonat (LAS)'ın zebra balığı embriyo ve larvalarında yarattığı toksik etkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Zebra balığı embriyolarına blastula aşamasında çeşitli konsantrasyonlarda (0,25 mg/l, 0,5 mg/L ve 1 mg/L) LAS uygulaması yapılmıştır. Embriyoların gelişimleri 5 gün boyunca invert mikroskop altında izlenmiştir. LAS uygulamasının zebra balığı embriyolarında ölüm oranına, anomali oranına, koryondan çıkış süresine ve boy uzunluğuna olan etkileri saptanmıştır. 24 saatlik embriyolarda ise akridin turuncusu boyaması ve TUNEL analizi yapılarak LAS uygulamasının hücre ölümüne olan etkisi tespit edilmiştir. LAS uygulamasının zebra balığı larvalarında oksidatif stres parametrelerine olan etkileri biyokimyasal yöntemler ile araştırılmıştır. Son olarak, LAS'a maruz bırakılan embriyo ve larvalardan 60 gün boyunca örnekler alınarak rutin histolojik takipler yapılmış, primordiyal germ hücrelerinin morfolojileri, göç yolu ve balıkların gonad gelişimi yapılan PAS, Best Carmin, Toluidin mavisi ve Alkalin Fosfataz boyama yöntemleri ile tespit edilmiştir.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deterjanlar

Deterjanlar içeriğinde bir ya da birden fazla anyonik yüzey aktif madde (sürfaktan) bulunduran toz, granül, jel ya da sıvı haldeki etkili temizlik ürünleridir. Deterjanlarda çoğunlukla, beyazlatıcı, yumuşatıcı, yağ çözücü, parlaklık verici ve antibakteriyel kimyasallar kullanılmaktadır. Sabun ve deterjanlar yapı olarak birbirinden farklıdır. Sabunlar, yağ asitlerinin suda çözünebilir sodyum ya da potasyum tuzlarıdır. Yağ asitlerinin fazlaca alkalileştirilmesi sonucu oluşurlar. Sabunlar, deterjanların daha doğal formlarıdır. Sabunlar sert sularda etkili olmamalarına rağmen deterjanlar, başta yüzey aktif maddeler olmak üzere içerdikleri kimyasallar nedeniyle sert sularda da etkili bir şekilde temizleyici özellik gösterirler.

Sabun ve deterjanlar sucul ekosistemlerde sıklıkla görülen kirleticilerdendir. Deterjanların özellikle sucul ekosistemde yarattığı kirlenme çok ciddi boyutlara ulaşmıştır. Deterjan aktif maddeleri, 0.5 mg/L'den yüksek derişimlerde köpük oluşturma özelliğine sahiptir. Oluşan köpük tabakası su yüzeyini kapayarak oksijen girişine engel olmaktadır. Ayrıca deterjandaki aktif maddeler, atıldıkları sularda ortamdaki oksijeni kullanarak biyokimyasal reaksiyonla ayrışırlar. Bu durum sucul ekosistemde ani bir oksijen düşüşüne sebep olabilir (Minareci ve ark., 2013). Sudaki oksijenin azalması sucul canlılar için ciddi bir tehdit oluşturmakta ve sucul ekosistemi doğrudan etkilemektedir. Bunun yanı sıra, deterjan atıkları fosfat içerdiklerinden sucul canlılarda toksik etkiler yarattığı gibi sucul ekosistemlerde ötrofikasyona[1] da sebep olmaktadır. Sucul ekosistemlerde oksijenin azalması, bulanıklığın artması ve dipteki birikimler sonucunda canlı türü azalmakta, su kalitesi bozulmaktadır (Egemen, 2000).

[1] Ötrofikasyon: Sucul ekosistemlerde azotlu ve fosforlu bileşiklerin çeşitli nedenlerle artması sonucunda plankton, alg ve yüksek su bitkilerinin aşırı oranda çoğalmasıdır.

Deterjanların yüksek organizasyonlu canlılarda (balık, fare, domuz, insan) dermatolojik, teratojenik, biyokimyasal ve histolojik hasarlara sahip olduğu pek çok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır (Palmer ve ark., 1975; Mathur ve ark., 1987; Nomura ve ark., 1987; Agarwal ve ark., 1990; Ishii ve ark., 1990; Trivedi ve ark., 2002; Rana ve Verma, 2005; Liwarska-Bizukoic ve ark., 2005; Mathur, 2005; Millar ve ark., 2005, Varsha ve ark., 2011). Deterjanların farelerde ciddi yan etkilere sebep olduğu tespit edilmiştir. Deterjana maruz kalan farelerde kan parametrelerinde azalma, iç organlarda histolojik hasarlar (kalpte hücre şişmesi, hücrelerarası alanda ödem, hücrelerde atrofi[2], dokuda hiyalinizasyon; böbrekte kortikal nekroz, tübüler atrofi; karaciğer hücrelerinde ödem ve nekroz; akciğerde hücreler arası alanda ödem, hücrelerde atrofi ve nekroz[3]; üreme organlarında yağ hücre birikimleri ve dejenerasyon) gözlenmiştir (Yahaya ve ark., 2011). Çamaşır suyu ve deterjanları soluyan farelerin soluk borusunda silli silindirik hücre uzunluğunda azalma, goblet hücrelerinde azalma, sil kaybı ve dokuda bozulma tespit edilmiştir (Vaezi ve ark., 2011).

Deterjanların gelişi güzel atılımı ve bunların atık sulara karışımının sucul canlılarda (*Rita rita, Orizias latipes, Cyprinus carpio, Clarias batrachus, Lepomis macrochirus, Pimephales promelas, Heteropneustes fossilis, Gambusia affiris, Oncorhynchus mykiss, Clibanarius africanus, Tympanotonus fuscatus, Pintius ticto*) pek çok hasara sebep olduğu bildirilmiştir (Roy, 1988; Toshima ve ark., 1992; Mittal ve Garg, 1994; Kline ve ark., 1996; Dorn ve ark., 1997; Trivedi ve ark., 2001; Rani ve ark., 2002; Sharma ve ark., 2004; Bakırel ve ark., 2005; Saxena ve ark., 2005; Chukwu ve Odunzeh, 2006; Varsha ve ark., 2011). Anyonik sürfaktan olan eter karboksilik türevlerinin *Daphnia magna, Vibrio fischeri, Selenastrum capricornutum ve Phaeodactylum tricornutum* üzerine olan toksik etkileri araştırıldığında *Vibrio fischeri'*nin sürfaktanlara diğer canlılardan daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Lechuga ve ark., 2016). Anyonik sürfaktanlardan biri olan lineer alkil benzen

[2] Atrofi: Normal boyuttaki organ, doku ya da hücrenin küçülmesine verilen addır.
[3] Nekroz: Bir hücre, doku ya da organın yaralanma, kanser, yanık gibi fiziksel ya da kimyasal etmenler sonucu ölümüdür. Patolojik hücre ölümü olarak da adlandırılmaktadır.

sülfonatın erişkin zebra balığı bireylerinde DNA kırıklarına sebep olduğu bildirilmiştir (Sobrino-Figueroa, 2013).

2.1.1. Yüzey aktif madde

Deterjanlar genellikle yüzey aktif maddeler, beyazlatıcılar, yapısal maddeler ve diğer yardımcı maddeler olmak üzere 4 kısımda sınıflandırılırlar. Yüzey aktif maddeler, kelimenin İngilizce karşılığı olan "surface active agent" kelimelerinden oluşan surfactant, sürfaktan olarak da adlandırılmaktadır. Yüzey aktif maddeler, suyla uzaklaştırılamayan maddeleri su ile temizlenebilir hale getiren ve temizleme işlemini en etkin biçimde sağlayan kısımlardır. Yüzey aktif madde, petrokimyasal veya doğal kökenli hammaddeler kullanılarak üretilir. Yüzey aktif madde, hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşur. Hidrofobik kısım, sulu çözeltilerde yüzey gerilimini azaltıp temizleme ve köpük oluşturma işlevini sağlamaktır. Hidrofilik kısım ise suda çözünme özelliği sağlar. Diğer bir deyişle, hidrofilik kısımları ile suya temas ederken, hidrofobik kısımları ile de organik bileşiklerle temas kurarlar. Böylece emülsiyonları (su ve yağ gibi) tek faz haline getirirler (Batıgöç, 2010).

Yüzey aktif maddeler, anyonik (negatif yüklü), noniyonik (yüksüz), katyonik (pozitif yüklü) ve amfoterik (pH'a bağlı olarak hem pozitif hem negatif yükte olabilen) olmak üzere 4 tiptir. Yüzey aktif madde çeşitleri için örnekler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Yüzey aktif madde tipleri ve bunlara ait örnekler

Yüzey Aktif Madde Tipi	Örnek
Anyonik	Lineer alkil benzen sülfonik asit (LAS), sabunlar, sodyum dodesil sülfat, lauril sülfat, di-alkil sülfosuksinat, ligno sülfonat
Noniyonik	4- nonilfenol polietoksilat, Triton-X, Tween 80, polisorbatlar, lauril glikozid vs.
Katyonik	Alkilbenzil dimetilamonyum klorür, tetrametil amonyum hidroksit, olaflur, setrimonyum klorür, setilpridinyum klorür
Amfoterik	Lesitin, alkil betadin, aminopropiyonik asit türevleri vb.

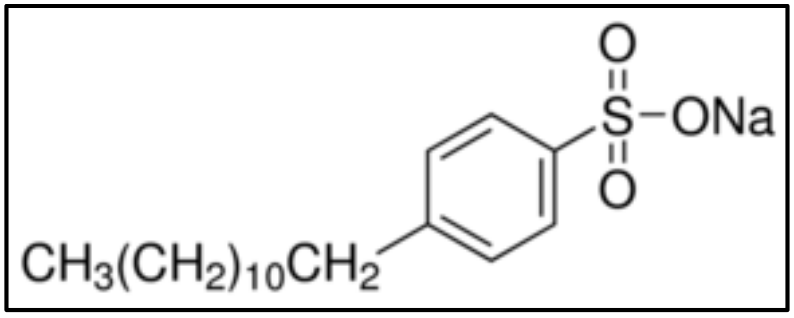
Yüzey aktif maddeler içerisinde leke ve kirleri çıkarma potansiyeli en yüksek olanı anyonik yüzey aktif maddedir. Katyonik yüzey aktif maddeler daha çok çamaşır yumuşatıcılarında ve çamaşır sularında kullanılırlar. Noniyonik yüzey aktif maddeler

köpük oluşumunu engelleyici maddelerdir. Genellikle anyonik ya da katyonik yüzey aktif madde ile birlikte kullanılırlar. Amfoterik yüzey aktif maddeler ise bünyelerinde hem artı hem eksi yükleri bulundururlar. Köpürme potansiyelleri vardır. Anyonik yüzey aktif maddeler ile özellikle şampuanlarda tercih edilirler (Batıgöç, 2010).

2.1.1.1. Lineer alkil benzen sülfonik asit

Lineer alkil benzen sülfonik asit ya da linear alkil benzen sülfonat (LABSA, LABS, LAS), deterjanların anyonik yüzey aktif maddelerinden en önemlilerinden biridir. Sodyum dodesil benzen sülfonat olarak da isimlendirilmektedir. LAS, tüm sürfaktanların yaklaşık olarak % 40'ını oluşturmaktadır (Scott ve Jones, 2000). LAS, suda yüksek oranda çözülebildiğinden gerek sanayi, gerekse evsel temizleme ürünleri olan sıvı, jel veya toz deterjanlarda yüksek yoğunlukta bulunur. Kısaca LAS, sentetik deterjan endüstrisinin ana ham maddelerinden biridir. Çamaşır ve bulaşık makinesinde kullanılan toz deterjanlarda, sıvı sabunlarda ve jel deterjanlarda da bulunmaktadır (Marcomini ve Giger, 1987).

LABSA 10 ila 14 karbon atomuna sahip olabilir (Şekil 2.1.). Ticari olarak kullanılan LAS, Avrupa'da ortalama 11,6, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise ortalama 12,3 alkil zincire sahiptir. Sülfofenil grup genellikle iç karbonlardan 4., 5. ya da 6. karbonun üzerinde bulunur. Bu farklılıklar LAS'nın etkilerini de değiştirir. LAS'nın toksisitesi alkil zincir uzunluğunun artmasıyla ve fenil grubunun pozisyonunun dış karbonlara yaklaşması ile artmaktadır (Fendinger ve ark., 1994).



Şekil 2.1. 12 C'lu lineer alkil benzen sülfonik asitin kimyasal yapısı

En önemli çevresel kirleticilerden biri olan LAS endüstriyel ya da evsel kullanım sonucunda atık su yolu ile ekosisteme karışmaktadır. LAS'nın sucul ekosisteme karışması, suyun fiziksel ve kimyasal özelliğini değiştirmektedir. Bu durum, balık solungaçlarındaki oksijen değişim oranını etkilemektedir (Akyüz ve Roberts, 2002). Ayrıca sürfaktanlar organizma bünyesine katılarak pek çok yan etkiye sebep olurlar. LAS'nın subletal dozlardaki maruziyeti sonucu balıkların solungaç, bağırsak, yüzme kesesi, böbrek ve gözlerinde patolojik etkiler tespit edilmiştir (Sarasquete ve ark., 1997).

Anaerobik koşullarda sürfaktanlar kısmen parçalanabilme özelliğine sahiptir (Ying, 2006). Pek çok sürfaktan (ör: LAS, yağ alkol etoksilatları, alkol etoksilat, alkilfenol etoksilat, dimetil amonyum klorür vb.) aerobik koşullarda daha iyi parçalanabilme özelliğine sahiptir. LAS, non-lineer alkil benzen sülfonata göre doğada daha hızlı parçalanır (degrade olur) (Gledhill, 1975; Nomura ve ark., 1998). LAS'ın yarı ömrü yüzey sularında 1-2 gün, aerobik sedimentlerde 1-3 gün, denizlerde ve nehir ağızlarında 5-10 gün (International Programme on Chemical Safety, 2015), karasal ekosistemde ise 1-3 hafta (Jensen, 1999) kadardır. LAS'ın biyodegredasyonu 2 aşamadan oluşur. 1. aşamada orijinal molekül yapısı bakteriyel faaliyetlerle değişmeye başlar (Terzić ve ark. 1992; Hršak, 1996). Sekonder biyodegredasyon ise, karbon dioksit, su, inorganik tuzlar ve bakterilerin normal metabolik süreçler sonucu oluşturduğu ürünlerin etkisi ile LAS molekülünün başka bir moleküle dönüştürülmesi şeklindedir (Akyüz ve Roberts, 2002). LAS'ın parçalanması alkil zincirinin, sülfonat grubunun ve en son benzen halkasının parçalanması ile oluşur (Hashim ve ark. 1992; Perales ve ark. 1999). Alkil zincirinin parçalanması terminal metil grubunun alkol aracılığı ile oksidasyonu (ω-oksidasyonu) ile başlar. Bunu aldehit ve karboksilik asit oluşumu takip eder. Reaksiyonlar alkan monooksijenaz ve iki adet dehidrogenaz enzimi ile katalizlenir. Daha sonra karboksilik asit β-oksidasyona uğrar ve iki karbon fragmenti asetil KoA gibi trikarboksilik asit döngüsüne girer. Son aşamada LAS'daki sülfonat grubu parçalanır (Scott ve Jones, 2000).

2.2. Zebra Balığı

2.2.1. Zebra balığı ile ilgili genel bilgiler

Zebra balığı, sazangiller familyasına ait tropikal bir balık türüdür. Gelişim biyolojisi ve toksikoloji çalışmalarında sıkça tercih edilen zebra balığı (*Danio rerio*)'nın doğal yaşam alanı, Himalaya'ların güney doğusundaki, Hindistan, Pakistan, Bangladeş ve Nepal'deki düşük debili, bol oksijenli küçük akarsulardır (Mayden ve ark., 2007). Pek çok ülkede akvaryumculukta da kullanılırlar.

Zebra balığının erginleri, yaklaşık 4-6 cm olup genellikle 2-3 yıl kadar yaşarlar. İdeal koşullarda zebra balıkları 5 yıla kadar yaşayabilirler (Gerhard ve ark., 2002). Gövdelerinde 7-9 adet gümüş rengi ve mavi çizgiler vardır. Dişiler, daha iri oluşları ve karınlarının şişkin oluşuyla erkeklerden kolayca ayırt edilebilirler. Erkekler daha ince düz bir yapıya sahiptir. Anal yüzgeçleri dişilere göre daha sarı renklidir (Şekil 2.2.). Zebra balıkları oldukça hareketli balıklardır. Sürü halinde yaşarlar ve yumurtlayarak çoğalırlar (Avdesh ve ark., 2012).



Şekil 2.2. a) Dişi zebra balığı, b) Erkek zebra balığı

Zebra balıkları su sıcaklığı bakımından geniş bir yelpazede yaşayabilir ve sıcaklık değişimlerine dayanıklıdır. 18-30 °C aralığında hayatını sürdürebilmektedir. Zebra balıklarının üremeleri oldukça kolaydır. Üremeleri için ideal sıcaklık 26-28 °C dir. Zebra balıklarını yumurtlatmak için akvaryuma dişi başına 2-3 ergin erkek birey konulur. 14 saat aydınlık - 10 saat karanlık ışık periyodu sonucunda her ergin dişi 50-200 civarında yumurta bırakır ve bu yumurtalar erkekler tarafından döllenir (Adu ve Thomsen, 2011; Avdesh ve ark, 2012).

2.2.2. Zebra balığının model organizma olarak kullanımı

Zebra balığı, uzun yıllardan beri bilimsel çalışmalarda model organizma olarak kullanılmaktadır. Kanser (Etchin ve ar., 2011; White ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2015), Alzheimer (Xia, 2010; Newman ve ark., 2014; Ebrahimie ve ark., 2016), Parkinson (Xi ve ark., 2011; Makhija ve Jagtap, 2014) gibi hastalıklarda, immün sistem ve rejenerasyon çalışmalarında (Kızıl ve ark., 2012; Gemberling ve ark., 2013), kardiyovasküler hastalıklarda (Major ve Poss, 2007; Bakkers, 2011), teratolojik (Lee ve ark., 2013; Akbulut ve ark., 2017) ve ekotoksikolojik çalışmalarda (Seok., 2008; Bambino ve Chu, 2017) zebra balığı erginleri ve embriyoları omurgalı modeli olarak kullanılmaktadır.

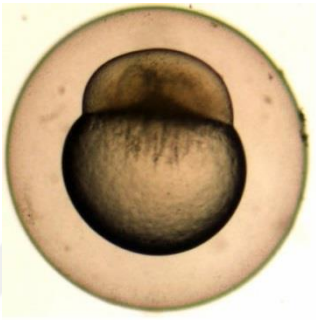
Zebra balığının model organizma olarak kullanılmasının çeşitli sebepleri ve avantajları vardır ve bunlar aşağıda sıralanmıştır:

-Zebra balığının tüm genom sekansının bilinmesi
-İnsan ile benzer genetik yapıya sahip olması (genomu %70 oranında insana benzer),
-Küçük ve dayanıklı olması,
-Üretiminin fareden daha ucuz ve kolay olması,
-Embriyo gelişiminin anne vücudu dışında olması,
-Şeffaf embriyolara sahip olduğu için gelişimin her aşamasının kolayca mikroskop altında gözlenebilmesi,
-Gelişiminin çok hızlı olması (2-3 ayda erginliğe ulaşması),
-Değişken çevre koşullarına dayanıklı olmasıdır.

2.2.3. Zebra balığının gelişim aşamaları

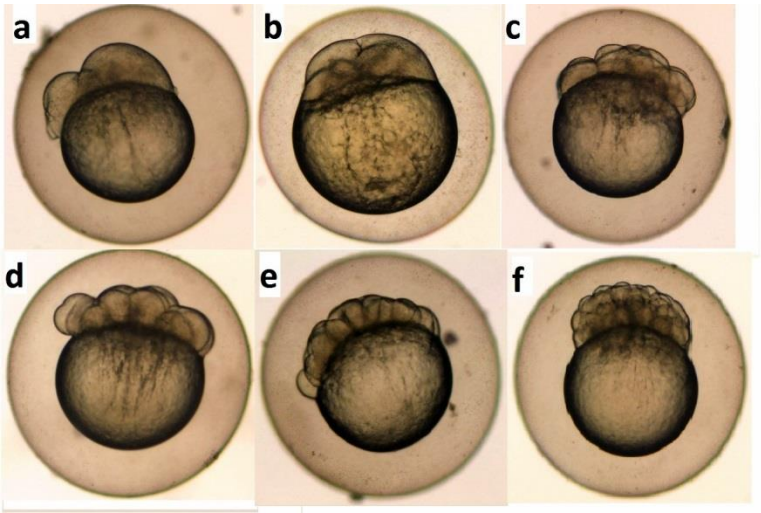
Zebra balığı gelişimi, zigot evresi, segmentasyon (yarıklanma) evresi, blastula evresi, gastrula evresi, faringula evresi, kuluçka evresi ve larval evre olmak üzere 7 evreden oluşmaktadır (Kimmel ve ark., 1995).

Zebra balığı yumurtaları ekstrem telolesital tipte yumurtalardır. Döllenme (fertilizasyon) anında yumurta yaklaşık olarak 0,7 mm çapındadır. Döllenme aşamasında koryon şişerek yumurtanın etrafını kaplar. Döllenme ile birlikte sitoplazmik hareket aktive edilir. Sitoplazma animal kutba doğru akmaya başlar ve blastodiski vejetal kutuptan ayırır. Döllenme gerçekleştikten sonra ilk bölünme 40-45. dakikada meydana gelir. Döllenme başlangıcından ilk bölünme gerçekleşinceye kadar olan evre ise zigot evresi olarak adlandırılır (Şekil 2.3.) (Kimmel ve ark., 1995).



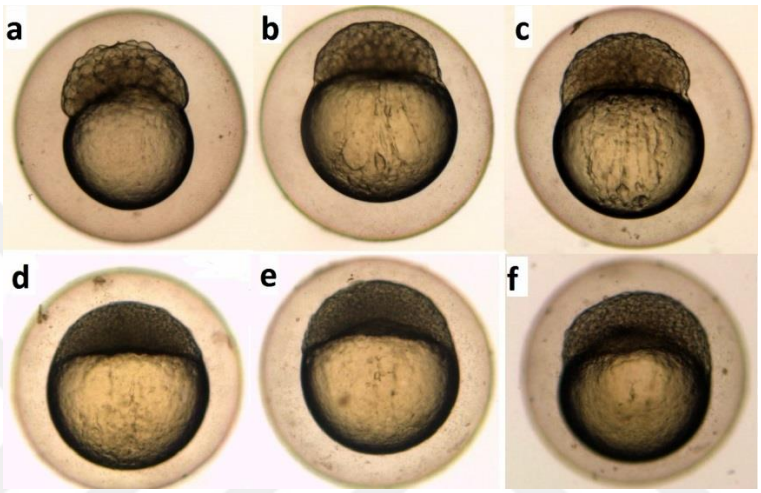
Şekil 2.3. Zebra balığı gelişiminde zigot evresi.

İlk bölünme animal-vejetal kutup ekseninde yani dikey düzlemde meydana gelir. İlk bölünmenin gerçekleşmesiyle segmentasyon evresi başlar. Bölünmeler meroblastik tiptedir ve oluşan hücreler "blastomer" olarak adlandırılırlar. Blastomerler sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı durumdadır. Segmentasyon aşamasında blastomerler 15 dakika aralıklarla bölünmelerine devam ederler (Şekil 2.4.) (Kimmel ve ark., 1995).



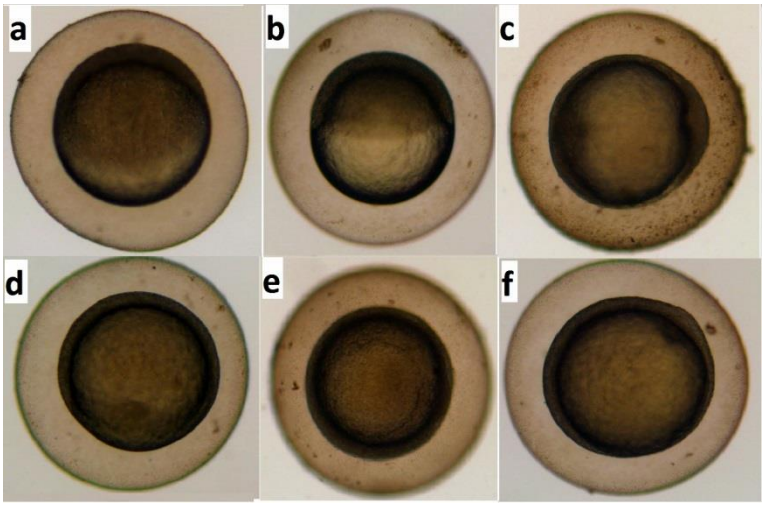
Şekil 2.4. Zebra balığı gelişiminde segmentasyon evresi. a) 2 hücreli evre, b) (0,75. saat) b) 4 hücreli evre (1. saat), c) 8 hücreli evre (1,25. saat), d)16 hücreli evre (1,5 saat) e) 32 hücreli evre (1,75. saat), d) 64 hücreli evre (2. saat).

Blastomerlerin art arda bölünmesi sonucunda embriyo 128 hücreli aşamaya ulaşır. Bu evrede blastodisk bir küreye benzer ve bu evredeki embriyo "morula" adını alır. Gelişimin bu evresi ise blastula aşaması olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada, midblastula geçişi (MBT), vitellüs sinsityal tabakasının (YSL) oluşumu ve epibolinin başlaması gibi önemli olaylar meydana gelir (Şekil 2.5.) (Kimmel ve ark., 1995).



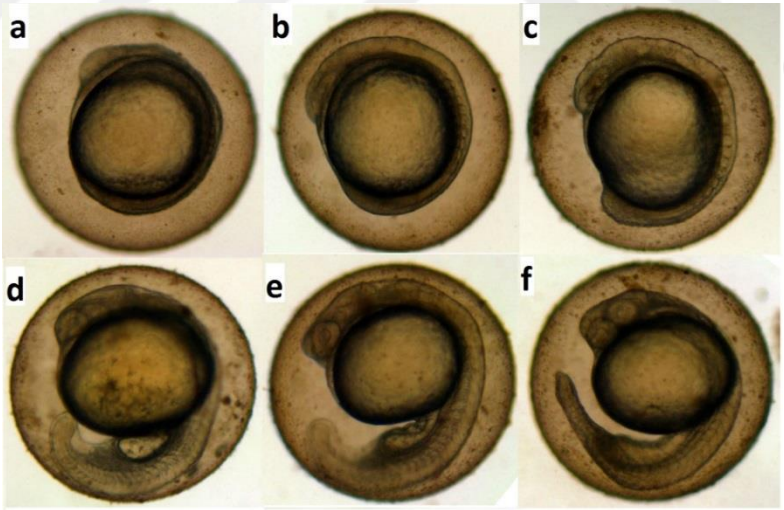
Şekil 2.5. Zebra balığı gelişiminde blastula evresi. a) 128 hücreli evre (2,25. saat), b) 256 hücreli evre (2,5. saat), c) 512 hücreli evre (2,75.saat), d) tümsek ve çevreleme evresi arası (3,5. saat), e) kubbe evresi (4,3. saat), f)%30 epiboli evresi (4,7. saat).

Epiboli, gastrulasyon boyunca devam eder. Bu evrede, epiboli ile birlikte involüsyondaki morfogenetik hücre hareketleri ile beraber primer germ tabakaları ve embriyonik eksen oluşur. İnvolüsyonun başlaması, gastrulasyonun başlangıcı olarak kabul edilir. Aynı zamanda bu evre, %50 epiboli evresi olarak da adlandırılır. Epibolinin sonunda vitellüs tamamen blastodisk ile çevrelenir ve germ halkası oluşur. Gastrulasyon evresinin sonunda balığın baş bölgesi belirginleşmeye ve kuyruk tomurcuğu oluşmaya başlar (Şekil 2.6.) (Kimmel ve ark., 1995).



Şekil 2.6. Zebra balığı embriyosunda gastrulasyon evresi a) Germ halka oluşumu b)%50 epiboli (5,25. saat), c) Kalkan evresinin animal kutuptan görünümü (6. saat), d) %90 epiboli (9. saat), e) Germ halka evresinin animal kutuptan görünümü, f) Tomurcuk evresi (10. Saat)

Gastrulasyon evresinden sonra somit oluşumu gözlenir. Primer organlar görülmeye başlar. Kuyruk tomurcuğu daha da belirginleşir ve embriyo uzamaya başlar. Vücut hareketleri görünür hale gelir (Şekil 2.7.) (Kimmel ve ark., 1995).



Şekil 2.7. Zebra balığı gelişimi, somit oluşumu. a) 2 somitli evre (10,7. saat), b) 8 somitli evre (13. saat), c) 10 somitli evre (14. saat), d) 18 somitli evre (18. saat), e) 22 somitli evre (20. saat), f) 1 günlük embriyo (24. Saat)

Zebra balığı gelişiminde, 24 ile 48. saatler arasındaki evre faringula evresi olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede pigment hücreleri farklılaşmaya ve dolaşım sistemi şekillenmeye başlar. Kan dolaşımı ve kalp atışı gözlenebilir hale gelir (Kimmel ve ark., 1995).

Gelişimin 48. saatinden itibaren kuluçka evresi başlar. Embriyo gelişmeye bu evrede devam eder ve vitellüs kesesi küçülmeye başlar. Embriyo bir önceki güne oranla daha aktif bir şekilde hareket eder (Koç, 2008). Larval evre gelişimin 3. gününden itibaren başlar. Zebra balığı embriyoları koryonlarından çıkmaya ve su içerisinde serbest bir şekilde yüzmeye başlar. Bu evredeki zebra balıkları prelarva olarak isimlendirilir. Zebra balığı, gelişimin 7. gününe kadar ağzı açılmadığı için dışarıdan verilen besinlerle beslenemez. Besin ihtiyacını kendi bünyesindeki vitellüs maddesinden karşılar. 7. günden sonra beslenmeye başlar ve artık larva olarak isimlendirilir.

Larva ile ergin balık arasındaki geçiş dönemi genç (juvenil) evre olarak isimlendirilir. Gelişimin 3. ayı itibari ile zebra balığı ergin evreye ulaşır.

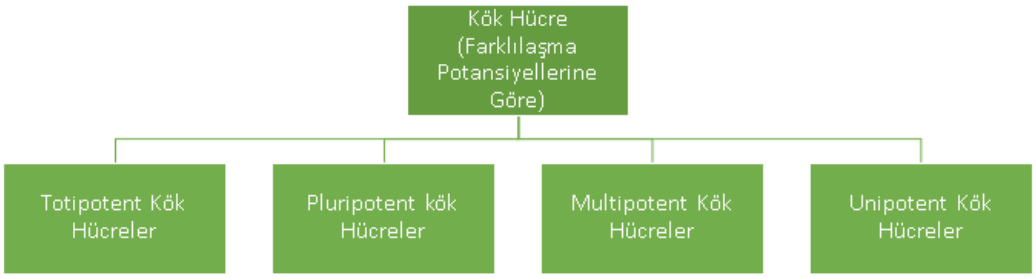
2.3. Kök Hücre

Organizmada elde edildiği bölgedeki hücrelere ya da farklı hücre tiplerine farklılaşabilen (plastisite özelliğine sahip), kendi kendine yenilenebilen, canlı kaldıkça çoğalabilen, özelleşmemiş hücrelerdir. Kök hücrenin hangi hücreye farklılaşacağı, hücre çekirdeğinde bulunan genlerden çıkan sinyaller tarafından belirlenir. Böylece kök hücreler, değişik hücre tiplerine dönüşebilmektedir (Güneş, 2005).

Telomerler, ökaryotik hücrelerin kromozom uçlarında bulunan heterokromatik tekrar bölgeleridir (Atlı ve Bozcuk, 2002). Normal hücrelerde, telomer uzamasından sorumlu olan sistemler hücre bölünmesi sırasında görev yapamazlar. Bu yüzden de telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Diğer bir deyişle, telomer uzunluğu hücrenin replikatif yaşam süresini belirler. Hücrede telomerler kısalığı kritik seviyeye ulaştığında hücrede yaşlanma programı aktive olur ve hücre bölünmesi durdurulur. Somatik hücrelerin aksine eşey hücrelerinde, bir sonraki nesile genetik bilgi transferi zorunluluğu olduğu için, telomerlerin bakımı telomeraz enzimi sayesinde aktif olarak yapılmaktadır (Güneri Yıldız ve ark., 2009). Telomeraz enzimi, telomer sentezinden sorumludur. Kök hücrelerde telomeraz aktivitesi fazla olduğu için telomer uzunluğu

da fazladır. Bu yüzden kök hücreler sınırsız bölünme özelliğine sahiplerdir (İnan ve Özbilgin, 2009).

Kök hücreler için farklı sınıflandırmalar mevcuttur. Kök hücreler, farklılaşma yeteneğine göre sınıflandırıldığında, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere 4 başlık altında sınıflandırılırlar (Şekil 2.8.). Totipotent hücreler, sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir. Ekstraembriyonik hücre tipleri de olmak üzere her hücre tipine farklılaşabilirler Totipotent kök hücrelere ait tek örnek fertilize yumurta hücresi olan zigottur (Blau ve ark., 2001; Bissels ve ark., 2013). Pluripotent kök hücreler, germ hücreleri de dahil olmak üzere vücuttaki tüm hücreleri oluşturabilme özelliğine sahiptir (Bissels ve ark., 2013). Bu hücreler totipotent hücreler gibi tek başına bir organizmayı oluşturamazlar (Oyar, 2016). Bu hücrelere örnek olarak embriyonik kök hücreler, blastokistin iç tabakasındaki hücreler, indüklenebilir pluripotent kök hücreler ve ektoderm, endoderm, mezoderm germ tabakalarından köken alıp embriyonik kök hücre farklılaşma aşamasının başlangıcında olan hücreler örnek verilebilir (Bissels ve ark., 2013; Kalra ve Tomar, 2014). Multipotent kök hücreler, ait oldukları dokuya benzer yapıda olan hücrelere farklılaşma özelliği gösteren kök hücre tipleridir. Farklılaşma yetenekleri pluripotent kök hücrelere göre daha azdır. Erişkin dokularda bulunup, bu dokularda tamir etme işleminde görevlilerdir. Bu dokulara örnek olarak eritrosit, trombosit ve lökositlere farklılaşabilen hematopoietik kök hücreler verilebilir (Kalra ve Tomar, 2014; Oyar, 2016). Unipotent kök hücreler ise sadece kendi hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Dokuda yenilenme görevi görürler. Örnek olarak kas kök hücreleri verilebilir (Kalra ve Tomar, 2014).

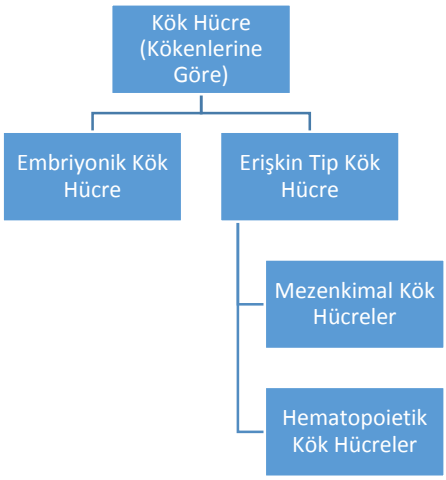


Şekil 2.8. Farklılaşma yeteneklerine göre kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücreler, elde edildikleri kaynaklara göre yetişkin kök hücreler ve embriyonik kök hücreler olmak üzere 2 başlık altında sınıflandırılırlar (Şekil 2.9.).

Erişkin tip kök hücreler, farklılaşmış dokuda yer alan farklılaşmamış hücrelerdir (Ural, 2006). Bu hücreler, ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların yenilenmesinde görev alır. Hematopoietik kök hücreler, kemik iliğinde bulunup kan dokunun tüm hücre çeşitlerine dönüşebilme özelliğine sahiptir. Mezenkimal kök hücreler ise bağ doku içerisinde bulunan kök hücreler olup, nöron, yağ, kas, kemik, kıkırdak gibi değişik hücrelere farklılaşma özelliğine sahiplerdir (Özen ve Sancak, 2014).

Embriyonik kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli erişkin tip kök hücrelere göre daha fazladır. Embriyonik kök hücreler, blastokistin iç hücre tabakasından elde edilirler ve kültür ortamında farklılaşmadan 1-2 yıl boyunca üreyebilirler (Güneş, 2005; Cannazik ve Polat, 2014). Embriyonik kök hücrelere primordiyal germ hücreleri örnek verilebilir.



Şekil 2.9. Elde edildiği kaynaklara göre kök hücrelerin sınıflandırılması

2.3.1. Primordiyal germ hücresi

Primordiyal (ilkel) germ hücreleri (PGH), embriyoda bulunan, gamet hücreleri olan sperm ve yumurtayı oluşturmak üzere gonad taslaklarına göç eden, pluripotent özellikteki embriyonik kök hücreleridir. Sperm ve yumurtanın öncül hücreleri olan primordiyal germ hücrelerinin gelişiminde 2 farklı aşama vardır. İlk aşamada embriyogenez sırasında primordiyal germ hücreleri şekillenir ve gonadal kabartılara doğru göç eder (Gomperts ve ark., 1994; Saffman ve Lasko, 1999). İkinci aşamasında ise germ hücreleri çevreden uygun sinyalleri alarak hücre bölünmesi, mayoz ve farklılaşma (spermatogenez, oogenez) işlemlerini gerçekleştirerek gametler oluşturulur (Nikolic ve ark., 2016). Kısacası PGH, gelişim süresince çoğalır, göç eder ve farklılaşırlar.

2.3.1.1. Primordiyal germ hücrelerinin morfolojik ve histolojik özellikleri

PGH, somatik hücrelerden morfolojik olarak farklıdır. Yuvarlak-oval ya da armutumsu şekilleri, büyük hücre hacimleri (10-20 µm çapında), büyük çekirdeğe (6-10 µm) sahip oluşları ve belirgin hücre sınırları ile diğer somatik hücrelerden ayrılırlar (Nagai ve ark., 2001; Koç ve Yüce, 2012; Chilke, 2012). 1-2 nükleolus ve dağılmış kromatin içeren nükleus, belirgin bir nükleus zarı ile çevrilidir (Braat ve ark., 1999). Elektron mikroskopi çalışmaları, PGH'lerinde "nuage" (Andre ve Rouiller, 1957) denilen RNA

ve protein birikiminden meydana gelen elektronca yoğun sitoplazmik birikimler olan bulutsu (Koç, 2008) bir yapının varlığını göstermiştir. Bu yapı genel olarak mitokondriler ile bir arada bulunur (Eddy, 1975). Elektronca yoğun olan bu yapı, PGH farklılaşması ya da oluşması için gerekli olan (Williamson ve Lehmann, 1996; Ikenishi, 1998) ve germ hücrelerine özel transkripsiyon ve translasyonu düzenleyen RNA ve proteinleri içermektedir (Seydoux ve ark., 1996; Williamson ve Lehmann, 1996; Seydoux ve Dunn, 1997; Van Doren ve ark., 1998b; Seydoux ve Strome, 1999).

Bu hücreler, çevresel sitoplazmalarında indikatör bir enzim olan alkalin fosfataz (hücre ya da hücre membranında bulunan, pH 8.5-10 aralığında aktivite gösteren bir enzimdir) aktivitesi içerirler (Koç ve Yüce, 2012). Bu yüzden, alkalin fosfataz boyası ile, sitoplazmasında çok fazla glikojen molekülleri içerdiği için ise Best carmin ve PAS gibi histolojik boyalarla özel olarak somatik hücrelerden farklı reaksiyon verirler (Yön ve Akbulut, 2015). Sitoplazmalarında eozinofilik granüller içerdiklerinden H&E boyası ile de spesifik reaksiyon verirler (Nagai ve ark., 2001; Akbulut ve ark., 2013).

2.3.1.2. Primordiyal germ hücrelerinin göç mekanizması

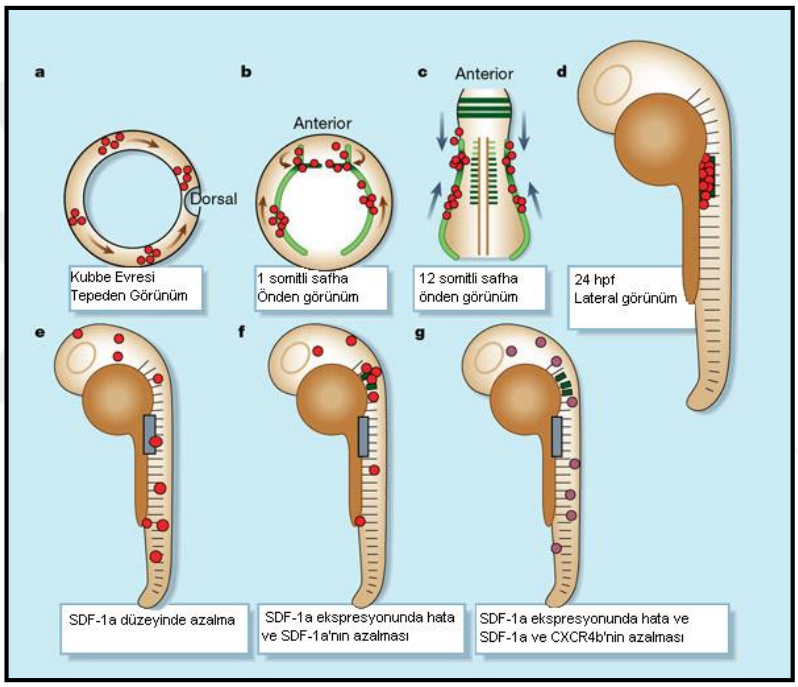
PGH, embriyonik gelişimin başlangıcında gonadal bölgeden farklı bir bölgede bulunurlar. Bu hücreler gelişimin ilk evrelerinde endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. Gonad taslaklarından aldıkları sinyaller doğrultusunda ameboid hareketlerle barsak taslağını saran dorsal mezenter boyunca ilerleyerek gonad taslaklarına doğru göç ederler. Gonad taslaklarına ulaşıp mezenşim içerisine girerler. Primordiyal germ hücrelerinin göç ettiği bu yol "gonad yolu" adını alır. Bu göç yolu her omurgalıda kendine özgüdür (De Felici, 2001; Baser, 2005; Koç, 2008; Wei and Liu, 2014). Somatik hücrelerle germ hücrelerinin karşılıklı ilişkisi gonadal farklılaşmada önemli bir rol oynamaktadır (Kocer ve ark., 2009). Çalışmalar sonucunda PGH'nin göç ederken gelişen embriyoda farklı somatik yapılarla etkileşim içinde olduğu tespit edilmiştir. PGH, gonad taslaklarına göç ettiklerinde somatik/ekstraembriyonik hücrelerin etrafını sararlar, yani bağımsızca tek başına o bölgede bulunmazlar. Bu yapılar genel morfogenetik hareketlerin bir parçası olarak PGH'nin uzak bölgelere ve hedef bölgeye gitmesini sağlarlar (Godin ve ark., 1990; Jaglarz ve Howard, 1995;

Zhang ve ark., 1997;van Doren ve ark., 1998a; Kuwana ve Rogulska, 1999; Weidinger ve ark., 1999; Deshpande ve ark., 2001; Starz-Gaiano ve ark., 2001; Weidinger ve ark., 2002). PGH'nin somatik hücrelerle yakın temas halinde olması, bu hücrelerin gerekli besinleri temin etmesini, totipotensi, yaşama ve göç için gerekli sinyalleri almasını sağlar (Wei and Liu, 2014). İzole edilmiş ve kültür ortamına alınmış primordiyal germ hücrelerinin canlılıklarını fazla sürdüremeyip apoptoza uğradıkları tespit edilmiştir (De Felici, 2000).

Primordiyal germ hücrelerinin, gonad taslaklarına nasıl göç ettikleri, hücre göçünde rol oynayan mekanizmalar ve moleküller son yıllarda bilim insanları tarafından sıkça araştırılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda primordiyal germ hücrelerinin bazı somatik yapılar ile etkileşim içerisinde bulundukları tespit edilmiştir. Zebra balıklarında PGH göçü gelişimin ilk 24 saati içerisinde gerçekleşmektedir (Weidinger ve ark., 1999; Weidinger ve ark., 2002). Zebra balıklarında PGH göçü eşsiz ve ilginç bir problemdir. Çünkü göç eden hücreler embriyonun gelişim eksenine göre blastodisk kenarında rastgele 4 farklı konumda konumlanmıştır (Yoon ve ark., 1997; Weidinger ve ark., 1999). Bu hücreler, gastrulasyon sırasında embriyonun dorsal yönünde göç ederler. Döllenmeden yaklaşık 10 saat sonra (1-3 somitli safha) ilk hedeflerine, 13 saat sonra ise (8-10 somitli safha) ikinci hedeflerine ulaşırlar. 24 saat sonunda ise vitellüs kesesi ile vitellüs uzantısı arasındaki bağlantı bölgesinde yer alan gonadal bölgede hücre kümeleri halinde lokalize olurlar (Saito ve ark., 2011). Yani, gelişimin ilk 24 saatinde tüm PGH'leri bir konumda toplanmıştır. Bu durum, ektopik bölgedeki PGH'leri tespit etmek için büyük bir avantajdır. Ektopik bölgelerdeki PGH, yaşamaları için gerekli olan sinyal ve faktörlerden uzak oldukları için bir süre sonra apoptoza uğrayarak ölürler (Stallock ve ark., 2003).

PGH'nin göçü ve gelişimi için kemotaksi büyük rol oynamaktadır. Zebra balıklarında PGH göçünde, SDF-1a (stromal-derived factor 1a) adlı proteinin ve bu proteinin reseptörü olan CRCX4b'nin rol oynadığı bilinmektedir. Zebra balıklarında CRCX4 reseptörünü kodlayan *crcx4b* geni susturulduğunda, PGH'nin gonadal bölgeye ulaşamadıkları ve göç yolunda aksaklıklar olduğu tespit edilmiştir SDF-1a, PGH'nin göç edeceği bölgelerden salınıp, bu hücreleri o bölgeye çeken bir kemokindir

(Kemokinler, hücreler tarafından salgılanan küçük sinyal proteinleri ya da sitokinklerdir. Göç etmekte olan hücrelerin hedeflerine varmalarına sağlayan kemosinyaller olarak da tanımlanabilir.). SDF-1a kemokini, PGH üzerinde bulunan CRCX4b reseptörünün ligandıdır. SDF-1a kemokini CRCX4 reseptörüne bağlandığı için bu kemokinin de göç sürecine etkisinin olabileceği düşünülmüş ve bu konuda araştırmalar yapılmıştır. SDF-1a düzeyi azaltıldığında da *crcx4b* mutasyonundaki etkilerin aynısı görülmüş ve PGH göçünü etkilemiştir (Şekil 2.10.) (Doitsidou ve ark., 2002; Knaut ve ark., 2003; Kunwar, 2003).



Şekil 2.10. a-d, Primordiyal germ hücrelerinin ilk 24 saat içerisindeki göç yolu (PGH kırmızı ile gösterilmiştir). a) embriyonun rastgele 4 bölgesinden dorsal orta çizgiye doğru göç eden PGH. b) SDF-1 RNA (yeşil renk ile gösterilmiştir) somitogenezin başlangıcında ilk segmentin yakınında fazlaca salgılanır ve PGH bu bölgeye doğru göç ederler. c) PGH kümeleri somit oluşumunun şekillenmesi boyunca SDF-1 a 'nın yüksek miktarda salındığı bölgeye doğru göç ederler. d) Gelişimin 24. saatinde PGH, vitellüs kesesinin dorsaline ulaşır. e) SDF-1a düzeyinde azalma olduğunda PGH, göç yolunu şaşırıp farklı bölgelere göç ederler. f) SDF-1a ekspresyonundaki hata sonucunda primordiyal germ hücreleri farklı bölgelere (ektopik bölgelere) göç ederler. g) SDF-1a mutasyonunda hata ya da SDF-1a ve CXCR4b düzeyinde azalma sonucu PGH (hücreler mor ile gösterilmiştir) ektopik bölgelerde görülmektedir (Kunwar, 2003).

SDF-1/CRCX4 kemokin-reseptör etkileşimi fare ve zebra balıklarında PGH göçünü sağladığı gibi pek çok tümör hücresinin metastazında da etkili rol oynamaktadır (Moore, 2001; Molyneaux ve Wylie, 2004). Ayrıca, SDF-1-CXCR4b sinyali omurgalılarda başta hematopoietik hücreler olmak üzere pek çok hücrenin göçünde de önemli bir rol oynamaktadır. Bu sinyal sistemi bozulduğunda, durum anormal hücre

göçü ile sonuçlanmaktadır (Murdoch, 2000; Blaser ve ark., 2005; Burger ve Kipps 2006; Lapidot ve ark., 2005; Zlotnik, 2006).

Hücre polarizasyonu ve migrasyonunu kontrol eden mekanizmalardan biri de göç eden hücrenin kenarlarında aktin polimerizasyonunun olmasıdır (Pollard ve Borisy, 2003; Rafelski ve Theriot 2004; Small ve Resch, 2005). Diğer bir mekanizma ise sitoplazmik basıncın itme gücü yaratarak hücre yüzeyinde çıkıntılar ve kabarcıklar oluşturmasıdır. Hücredeki akto-miyozin ağının kasılması sonucu hücre içerisinde hidrostatik bir basınç oluşur. Bu basınç sitozolü iter ve yalancı ayak (psödopod) oluşumuna sebep olur (Bereiter-Hahn, 1981; Bray ve White 1988; Janson ve Taylor 1993; Charrass ve ark., 2005). Bu modele göre hücre korteksindeki miyozin bağımlı kasılma, lokal hidrostatik basınç yaratmaktadır (Charras ve ark., 2005). Akto-miyozin kasılması Ca^{+2} bağımlı kinazların aktivasyonu sonucu Ca^{+2} iyonlarının hücre içerisine akın etmesiyle düzenlenir (Strohmeier ve Bereiter-Hahn, 1984; Strohmeier ve Bereiter-Hahn, 1987). SDF-1 tarafından CXCR4 aktivasyonu, hücre içi kalsiyum iyonunun artmasını sağlar (Bleul ve ark., 1996; Oberlin ve ark., 1996) CRCX4b baskılandığında hücrede Ca^{+2} miktarının azaldığı görülmüştür (Blaser ve ark., 2006).

Glikozaminoglikanların ve proteoglikanların PGH göçünde görev aldıkları tespit edilmiştir (Soto-Suazo ve ark., 2002). Heparan sülfat glikozaminoglikanlar (HS-GAG), ekstraselüler matrikste ve hücre yüzeyinde bulunurlar. Zebra balıklarında PGH göçünde rol oynarlar. HS-GAG, aynı zamanda PGH'de apoptozun inhibisyonunu sağlar. Hücrelerden HS-GAG uzaklaştırıldığında zebra balıklarında PGH'nin apoptoza uğradıkları görülmüştür. Heparan sülfat eksikliğinde ise PGH'nin hem sayısının azaldığı hem de yanlış yöne göç ettikleri tespit edilmiştir (Wei and Liu, 2014).

Kadherinler, hücre adezyonunda (yapışmasında) ve hücrelerin birbirine sıkıca bağlanmasında rol oynayan kalsiyum bağımlı adezyon moleküllerideir. Kaderinlerin, hücrelerin ve dokuların yapısal formlarının oluşmasında ve hücrelerin göç etmesinde önemli rolleri vardır (Tepass ve ark., 2000). E-kaderinler, kaderin moleküllerinin bir çeşidi olup erken embriyonik devrelerde fazla miktarda üretilirler. E-kaderinlerin üretimi PGH'nin şekillenmesini sağlar. PGH şekillendikten sonra göç etmeye başlarlar

ve hücrelerin göçü sırasında E-kaderin üretimi azalır. PGH gonad taslaklarına ulaştığında ise üretimi artar (Molyneaux ve Wylie, 2004).

2.4. Zebra Balığında Gonad Oluşumu

Omurgalı canlılarda cinsiyet oluşum mekanizması, gonadların testis ve ovaryuma farklılaşması, genetik faktörlere bağlıdır. Genetik faktörlerin yanısıra çevresel faktörler de cinsiyet farklılaşmasında etkin rol oynarlar (Bull, 1985; Budd ve ark., 2015; Santos ve ark., 2017). Örneğin sıcaklığın, zebra balıklarında cinsiyet farklılaşmasında çok önemli bir rolü vardır. Diğer bir örnek, endokrin bozucu kimyasallar için verilebilir. Bu kimyasallar, zebra balıklarında cinsiyet değişimine yol açıp, cinsiyet farklılaşmasına etki edip populasyondaki cinsiyet oranında dengesizliğe yol açabilirler (Santos ve ark., 2017).

Sıcaklık da zebra balıklarında cinsiyetin belirlenmesini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Embriyonik dönemde 33-37 °C gibi yüksek sıcaklıklarda yetiştirilen veya gonad farklılaşması evresinde sıcaklığa maruz kalan zebra balıklarında cinsiyetin erkek olarak farklılaştığı tespit edilmiştir (Uchida ve ark., 2002; Abozaid ve ark., 2011, 2012; Brown ve ark., 2015; Luzio ve ark., 2016a; Ribas ve ark., 2017). 22-23°C gibi düşük sıcaklıklar ise gonad oluşumunun gecikmesine yol açmakta fakat cinsiyet farklılaşmasına etki etmemektedir (Luzio ve ark., 2016a; Ribas ve ark., 2017).

Hipoksi, zebra balıklarında cinsiyet hormonlarını üreten genlerin (*3β-hsd, cyp11a, cyp19a* ve *cyp19b*) ekspresyonun azalmasına yol açıp testosteron/östrojen oranını artırmaktadır. Böylece popülasyonda erkek bireylerin oranı artmaktadır (Shang ve ark., 2006). Bunun yanı sıra, hipoksik ortamda yetişen zebra balığı embriyolarında PGH göçünde hasarlar, testosteron ve östrojen konsantrasyonlarında değişimler gözlenmiş ve cinsiyetin erkek yönünde belirlendiği tespit edilmiştir (Shang ve Wu, 2004; Lo ve ark., 2011; Robertson ve ark., 2014).

Zebra balıklarında gonad gelişiminde ilk aşamada farklıklaşmamış bir gonad oluşur. Bu yapı daha sonra olgunlaşmış testis ve ovaryuma farklılaşır (Takahashi, 1977; Uchida ve ark., 2002, Maack ve Segner, 2003; Wang ve ark., 2007a,b). Zebra balıklarında gonad farklılaşması genel olarak gelişimin 25. günü itibari ile başlar, 60. gün itibari ile tamamlanmış olur (Takahashi, 1977; Uchida ve ark., 2002) .

Zebra balıklarında ovaryum-testis farklılaşmasında apoptoz önemli bir rol oynamaktadır. Apoptozun inhibe edilmesi, ovaryum gelişimi ve canlılığının sürdürülmesinde, dişi fenotipinin oluşumunda gereklidir (Uchida ve ark., 2002; Pradhan ve ark., 2012; Dranow ve ark.., 2013; Luzio ve ark., 2016a). Tam tersine apoptoz oluşumu, ovaryum gelişiminin baskılanmasına ve gonadın testise farklılaşmasına sebep olmaktadır (Uchida et al., 2002; Rodríguez-Marí ve ark., 2010; Shive ve ark., 2010; Rodríguez-Marí ve ark., 2011; Tzung ve ark., 2015). Zebra balığı embriyoları koryondan çıktıktan 23-35 gün sonra gonadlarında apoptotik hücreler tespit edilmiş ve bu balıkların erkek olduğu anlaşılmıştır (Uchida ve ark., 2002). Yine diğer bir çalışmada *fanconi anemia complementation group L* (*fancl*) genindeki mutasyonların germ hücre apoptozunu indüklediği ve sonuç olarak zebra balıklarında erkekleşmeye yol açtığı tespit edilmiştir. *fancl* mutant zebra balıklarındaki oosit kaybı kaspaz-3-bağımlı apoptozun anormal derecede artması ile oluşmaktadır (Rodríguez-Marí ve ark., 2010).

SRY (sex determining region Y)-*box 9a* (*sox9a*) geni ve *p53* geninin ekspresyonundaki artış, genç zebra balıklarında ovaryum foliküllerinin apoptozuna neden olarak gonad yapısının testise farklılaşmasını sağlamaktadır (Sun ve ark., 2013).

Zebra balıklarında hem dişilerde hem de erkeklerde cinsiyet oluşumuna ve dimorfizme etki eden genlerle ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu genler, *anti-Müllerian hormone (amh), fushi tarazu factor-1 (ftz-f1), DM-related transcription factor 1 (dmrt1), 17-beta hydroxysteroid dehydrogenase 3 (hsd17b3), breast cancer 2 (brca2), piwi-like RNA-mediated gene silencing 1 (piwil1, ziwi olarak da bilinir), DAZ interacting zinc finger protein 1 (dzip1), nuclear receptor subfamily 5 group A member 1b (nr5a1b), cytochrome P450 family 19 subfamily A polypeptide 1a (cyp19a1a) ve 1b*

(cyp19a1b), DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (ddx4, vasa olarak da bilinir), baculoviral IAP Repeat Containing 5 (birc5), growth differentiation factor 9 (gdf9), forkhead box L2 (foxl2a ve foxl2b), fancl ve *sox9* dur. (Chiang ve ark., 2001; Tan ve ark., 2002; Bartfai ve Orban, 2003; Krøvel ve Olsen, 2004; Guo ve ark., 2005; Rodríguez-Marí ve ark., 2005, von Hofsten ve ark., 2005; Houwing ve ark., 2007; Santos ve ark., 2007; Wang ve Orban, 2007; Jørgensen ve ark., 2008; Sreenivasan ve ark., 2008; Small ve ark., 2009; Chen ve ark., 2017; Luzio ve ark., 2010, Shive ve ark., 2010; Luzio ve ark.,2011; Sun ve ark., 2013; Wong ve ark., 2014; Luzio ve ark.,2016b; Yang ve ark., 2017). Bu genler, zebra balıklarında gonad farklılaşmasında görev olan sinyal yolaklarında görev alan genlerdir. Bu yolaklardan bazıları *Piwi/piRNA* yolağı (Houwing ve ark., 2007), *Tp53/fancl* (Rodríguez-Marí ve ark., 2010), *brca2* (Shive ve ark., 2010; Rodríguez-Marí ve ark., 2011; Rodríguez-Marí ve Postlethwait, 2011), apoptoz (Shive ve ark., 2010; Rodríguez-Marí ve ark., 2010, 2011; Luzio ve ark., 2016b), *nükleer faktör kappa B (NF-κB)* (Pradhan ve ark., 2012), ve *Wnt* (Sreenivasan ve ark., 2014) sinyal yolaklarıdır.

Primordiyal germ hücreleri de cinsiyet farklılaşmasında ve ovaryum oluşumunda büyük rol oynamaktadırlar. PGH yokluğunda, apoptoza uğradığında ya da balığın mutant PGH'ne sahip olması durumunda gonad testis yönünde farklılaşmaktadır (Slanchev ve ark., 2005; Siegfried ve Nusslein-Volhard, 2008; Rodríguez-Marí ve ark., 2010; Dranow ve ark., 2013; Tzung ve ark., 2015). Somatik hücreler tarafından çevrilen primordiyal germ hücreleri, cinsiyet farklılaşmasını sağlayan genlerin ekspresyonunu kontrol ederek folikül oluşumunu destekler ya da testis oluşumunu inhibe eder (Siegfried ve Nusslein-Volhard, 2008).

Zebra balıklarında gelişimin 8. gününden itibaren, PGH, mezenterin her iki tarafındaki sölomik boşluk etrafında yer alır. Bazı PGH ise barsakların bulunduğu bölgede görülürler. PGH'deki mitotik aktiviteler gelişimin 15. günü, mayotik aktiviteler ise gelişimin 22.günü itibari ile daha belirgin bir şekilde gözlenebilir (Okuthe ve ark., 2014). Gelişimin 4. haftasında mayotik germ hücrelerini içeren gonad yapısı gözlenir ve gonad oluşumunun yaklaşık %86'sı tamamlanmıştır (Maack ve Segner, 2003). Gelişimin 5. haftasından itibaren dişi zebra balığı gonadında oogonyum, pre-

vitellojenik oositler ve germ hücreleri gözlenebilir. Bu aşamada bireylerde oositlerin sayıca azalması ve küçülmesi, oositlerin şekillerinin düzensizleşmesi gibi gonad morfolojisinde değişimler meydana gelebilir. Bazı gonadlarda dejenere oositler gözlenebilir. Stromal hücreler sayıca artar ve gonadal matriks içerisine girerler. 7. hafta itibari ile gonial hücreler artarak kist benzeri grupları oluşturarak gonad morfolojisinde farklılaşmalara sebep olurlar. Bu durum sekonder gonadogenezin (testis oluşumunun) belirtileridir (Okuthe ve ark., 2014). 11. hafta itibari ile spermatogonyum, spermatosit ve spermatidler testisin % 40'ını oluştururlar (Maack ve Segner, 2003; Okuthe ve ark., 2014).

2.5. Apoptoz

Canlılarda hücre ölümü gerekli bir fizyolojik olaydır. Organizmada bir yandan yeni hücreler oluşurken bir yandan da yaşlanmış ya da hasar görmüş hücreler ortadan kaldırılarak denge korunmaktadır. Organizmada hücreler, fizyolojik (apoptoz) ya da patolojik (nekroz) olarak ortadan kaldırılırlar.

Yunanca "yaprak dökülmesi" anlamına gelen apoptoz, organizmada homeostazı koruyan olaydır. Apoptoz, hücrenin genleri düzenleyip, RNA, protein sentezi ve enerjiye ihtiyaç duyarak programlı bir şekilde kendini öldürdüğü hücre ölümü çeşididir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Çok hücreli organizmalarda hasarlı hücrenin yok edilmesi apoptoz yolu ile olmaktadır. Böylece hasarlı hücrenin çoğalmasının ve tümör oluşumunun önüne geçilmektedir (Evan ve Littlewood, 1998). Apoptotik hücreler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilirler. Apoptozun embriyo gelişimi sırasında da önemli rolü vardır. Memelilerde embriyo gelişiminde el ve ayak parmakları arasındaki perdelerin kalkması, merkezi sinir sisteminin gelişmesi, kan damarlarının sayısının azalması gibi olaylar apoptoz sayesinde gerçekleşir. Doğum sonrası yaşamda da kan hücrelerinin belirli sayıda tutulması, menstruel siklus sırasında endometruyum tabakasının dökülmesi, deride bazalde yeni hücreler oluşurken en üst tabakadaki

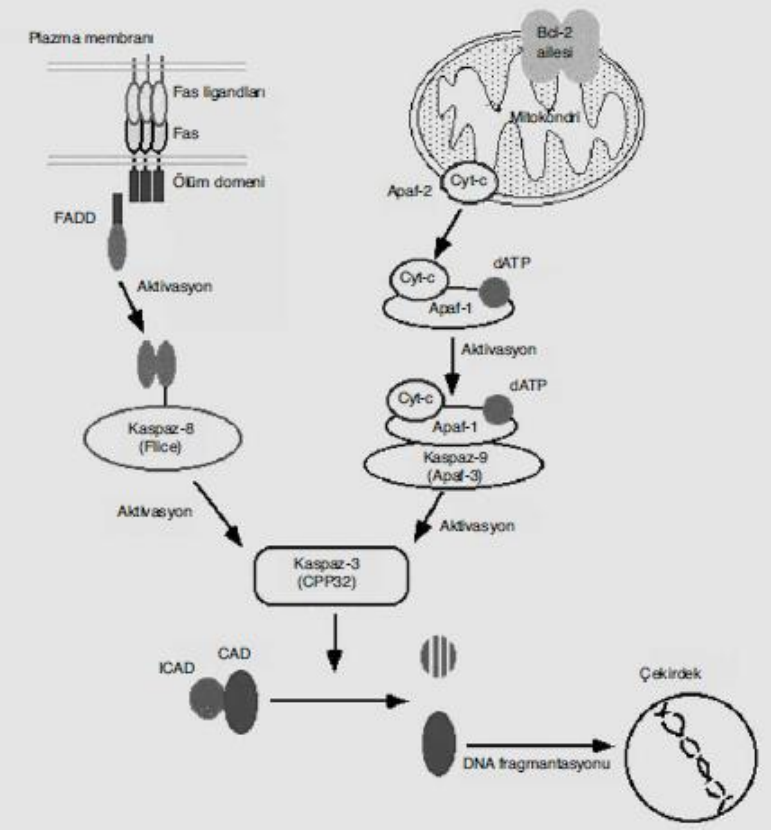
hücrelerin ölmesi gibi olaylar apoptoz sayesinde gerçekleşmektedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

Apoptoz sırasında hücrede pek çok morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir. Apoptoz sinyalini alan hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparark bulunduğu ortamdan uzaklaşır. Hücrede Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketi durur ve hücre büzüşür. Çekirdekte bulunan proteinlerin parçalanması sonucu çekirdek ve kromatin yapısı yoğunlaşır ve çekirdek piknotik (büzüşmüş, kromatin yapısı yoğunlaşmış) görünüme kavuşur. Hücre küçülmeye devam eder ve çekirdek parçalara ayrılır. DNA nükleozomdan ayrılır, jel elektroforezinde merdiven bant şeklinde görülür. Hücre zarında tomurcuklanmalar meydana gelir. Hücre zarının iç kısmında yer alan fosfotidilserin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle hücre zarının dış yüzüne transfer olur. Hücre, içerisinde organel ve sitoplazma parçaları olan zarla çevrili küçük parçalara ayrılır yani apoptotik cisimler meydana gelir (Güleş ve Eren, 2008; Akşit ve Bildik, 2008; Coşkun ve Özgür, 2011).

Apoptozu baskılayan genler *Bcl-2* grubu genleri (*BHRL–1, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1*), *c-abl* geni, *ras* onkogeni, çözülebilir *fas*, *p35, A20*, indükleyen genler ise Bcl-2 grubu genleri (*Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bid, Bik, Hrk-1*), *c-myc, p53, p21, fas* (*CD95/APO1*) *FADD/MORT, RIP, FAST* gibi genlerdir (Akşit ve Bildik, 2008). Apoptozda hücredeki *Bcl-2* düzeyinin önemli bir rolü vardır. Hücrede apoptozun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini *Bax/Bcl-2* dengesi belirler. Apoptozun gerçekleşmesi için Bax düzeyinin *Bcl-2*'den fazla olması gerekir (Canpolat, 2016).

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, *Bcl-2* ailesi molekülleri, seramid, kaspazlar, p53, sitokrom c gibi moleküller ile mitokondriler rol oynamaktadır. Apoptoz sırasında sürekli olarak hücre içerisine kalsiyum girişi meydana gelmektedir (Akşit ve Bildik, 2008; Coşkun ve Özgür, 2011). Hücre, apoptoz sinyallerini, ölüm aktivatörlerinin hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla hücre dışından ve çeşitli sinyallerle ölüm aktivatörlerinin devreye sokulmasıyla hücre içerisinden olmak üzere 2 yolla alır (Canpolat, 2016). Apoptozu uyaran hücre dışı sinyallere hormonlar,

büyüme faktörlerinde eksilme, bitişik hücrelerin teması örnek verilebilir (Canpolat, 2016). Hücre dışından gelen apoptoz sinyalleri olan *FasL, TNF alfa, Apo3L, Apo2L, Apo2L*, sırasıyla ölüm reseptörleri olan *Fas, TNF-R, DR3, DR4* ve *DR5*'e bağlanarak ölümü indükleyen sinyal komplekslerini oluşturarak kaspaz-8'i aktive edip DNA fragmentasyonuna yol açarlar (Adams ve Cory, 2001; Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark., 2004; Elmore, 2007). Apoptoza neden olan hücre içi sinyallere ise iyonize radyasyon, viral enfeksiyon, oksidatif hasarlar, ATP/ADP ve NADH'ın azalması, hipoksi ve hücre içi Ca^{+2} düzeyinin artışı örnek verilebilir (Canpolat, 2016). Bu sinyaller hücrenin yaşaması için gerekli bir sinyal olan *Bcl-2*'yi inaktive ederek, apoptozu uyaran *Bax* ve *Bak*'ı aktive ederler. Bunun sonucunda mitokondri permeabilitesi bozulur ve mitokondri zarında por oluşumu gerçekleşir. Mitokondriden AIF, sitokrom-c, Smac ve endonükleaz-G salınımı gerçekleşir. Sitokrom C, Apaf-1 (Apoptotik preoteaz aktive eden faktör) ve kaspaz-9 ile birleşerek apoptozom adı verilen bir kompleksi oluşturur. Bu kompleks, hücre içi kalsiyum artışı ile beraber diğer kaspazları aktifleştirir. Kaspazların birbirini aktifleştirmesi sonucunda proteolitik bir zincir oluşturarak hücre iskeleti yıkılır, sitoplazmadaki proteinlerin ve DNA'nın yıkımı gerçekleşir (Şekil 2.11.) (Adrain ve Martin, 2001; Baines, 2010; Canpolat, 2016).



Şekil 2.11. Hücre içi ve hücre dışından gelen ölüm aktivatörleri ile oluşan apoptoz mekanizması (Gültekin ve ark., 2008)

Apoptotik hücreler, çeşitli yöntemlerle tespit edilebilir. Bu yöntemler aşağıda sıralanmıştır (Coşkun ve Özgür, 2011):

a) Morfolojik Görüntüleme
-Işık Mikroskobu (H&E ve Giemsa boyaması)
-Faz Kontrast Mikroskobu
-Elektron Mikroskobu
-Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop
-Propidium İyodür (PI)
-Hoechst Boyası

b) İmmunokimyasal Yöntemler
-Annexin V
-TUNEL

-M-30

-Kaspaz-3

c) Biyokimyasal Yöntemler

-Agaroz Jel Elektroforezi (DNA Fragmentasyonu)

-Western Blotting (substrat kırılmaları, aktif kaspaz ve sitokrom c tayini)

-Flow sitometri

d) İmmunolojik Yöntemler

-ELISA (DNA fragmentasyonu, M30 düzeyi)

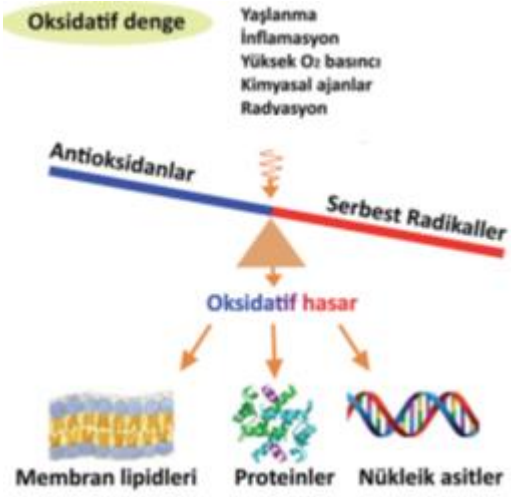
-Fluorimetrik Yöntem (Kaspaz aktivasyonu)

e) Moleküler Biyoloji Yöntemleri

-DNA Mikroarray

2.6. Oksidatif Stres

Oksidatif stres ise serbest radikaller ile bunların etkilerini ortadan kaldıran antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasıdır (Şekil 2.12.) (Özcan ve ark., 2015).



Şekil 2.12. Hücrede oksidatif hasar oluşumu (Özcan ve ark., 2015).

Serbest radikaller hücrede 3 farklı şekilde meydana gelebilir (Kılınç ve Kılınç, 2002):

1. Homolitik bölünme şeklinde (Kovalent bağlı bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalması)

$$A : B \rightarrow A\bullet + B\bullet$$

2. Normal bir molekülün bir elekton kaybına uğraması ile

$$A - e^- \rightarrow A\bullet^+ + e$$

3. Normal bir moleküle bir elektron eklenmesi ile

$$A + e^- \rightarrow A\bullet^-$$

Serbest radikallerden reaktif oksijen türleri (ROT) son yörüngesinde bir ya da birden fazla ortaklanmamış elektron içeren, reaktif ve kararsız özelliğe sahip atom ya da moleküllerdir. Eşleşmemiş elektronlar çok yüksek enerji içerdiği için oldukça reaktif ve kısa ömürlü moleküllerdir (Özcan ve ark., 2015; Çiftçi, 2017). Serbest radikaller, düşük yoğunlukta olduğunda hücrede, enfeksiyonlara karşı savunma, kanser hücrelerinin öldürülmesi ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, intrasellüler depolardan kalsiyum salınımı, tirozin amino asidini fosfatlama aktivasyonu ve büyüme faktörü sinyallerinin aktivasyonu gibi hücrede yararlı etkilere sebep olabilirler (Karabulut ve Gülay, 2016). Fakat genel olarak bu moleküller, hücrede enerji üretimi için gerçekleştirilen pek çok reaksiyon sırasında üretilebilirler ve membran lipitlerine, hücre içi proteinlere ve nükleik asitlere etki edip makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarını bozarak hücresel hasara yol açarlar (Özcan ve ark., 2015).

ROT, başta mitokondri olmak üzere hücre organellerinde normal metabolizmal aktivite sonucunda meydana geldikleri gibi, yaşlanma, iskemi-perfüzyon, radyasyon, çeşitli kimyasallara maruz kalma ve yüksek oksijen basıncı gibi sebeplerin sonucu olarak da üretilirler (Tabakoğlu ve Durgut, 2013; Özcan ve ark., 2015). Kısaca, ROT oluşumuna sebep olan etkenler hücre içi ya da hücre dışı kaynaklı olabilir. ROT, hem süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidroksil radikali ($HO^{\bullet}$), peroksi ($ROO^{\bullet}$), alkoksi ($RO^{\bullet}$) gibi serbest radikal molekülleri, hem de singlet oksijen ($^1O_2$), ozon (O_3), hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit (HOCl), nitrik oksit (NO^-) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi radikal olmayan molekülleri içermektedir (Halliwell ve Gutterdige, 1996).

Oksidatif denge bozulduğunda, yani ROT miktarı artıp, bunun etkilerini nötralize edebilecek antioksidan sistemin aktivitesi azaldığında, hücre içi proteinlerinde yapısal ve fonksiyonel hasarlar, hücre zar yapısında bozulma, DNA'da yapısal hasarlar meydana gelir (Özcan ve ark., 2015).

Antioksidan sistemler, hücrede serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin vereceği hasarı engelleyen savunma mekanizmalarıdır. Antioksidan sistemlerin etki mekanizmaları aşağıdaki gibidir (Özcan ve ark., 2015):

-Oksijeni ortamdan uzaklaştırarak bölgesel olarak bulunduğu yerde konsantrasyonunu azaltırlar.
-Katalitik metal iyonlarını ortamdan uzaklaştırırlar.
-ROT'ni ortamdan uzaklaştırırlar ya da daha zayıf bir moleküle dönüştürürler.
-Serbest radikal hasarına sebep olan zincirleme reaksiyonların oluşmasını engellerler.
-Serbest radikallerin yarattığı hasarı onarıcı etki gösterirler.

Antioksidanlar aracılığı ile savunma, hücre içi (endojen) ve hücre dışı (ekzojen) olmak üzere 2 şekilde yapılır (Gupta ve ark., 2014). Hücre dışı antioksidanlara, askorbik asit, A ve E vitamini, β-karoten örnek verilebilir. Hücre içi antioksidanlara ise, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon S-transferaz (GST) ve süperoksidi detoksifiye eden sitokrom oksidaz gibi enzimler örnek verilebilir.

Katalazın temel görevi, moleküler oksijen varlığında metabolizmada sentezlenen H_2O_2'nin su ve oksijene dönüşmesini katalizlemek ve hücrede özellikle zarlarda oluşabilecek hasarı önlemektir (Keha ve Küfrevioğlu, 1997; Seriner ve Bilgin, 2012). H_2O_2, serbest radikal olmamasına rağmen bir geçiş metali ile (demir, bakır vb.) tepkimeye girip serbest radikal üretip hücre zarları vasıtasıyla hücreye girebilmektedir (Colleen ve ark., 2007; Akkuş, 1995). En yüksek CAT aktivitesine bol miktarda peroksizom içeren kan, kemik iliği, mukoz membranlar, böbrek ve karaciğer gibi dokularda rastlanmaktadır (Sezer ve Keskin, 2014).

Glutatyon (γ-glutamilsisteinilglisin), hücrede indirgenme-yükseltgenme dengesini koruyan ve oksidatif strese karşı kullanılan önemli bir antioksidandır (Sezer ve Keskin, 2014). Aminoasitlerin hücre içerisine taşınmasında ve proteinlerdeki sülfidril grupların korunmasında görev alırlar (Onat ve ark., 2006). Glutatyon peroksidazın kofaktörü olan indirgenmiş glutatyon (GSH) ise sahip olduğu tiyol grubu sayesinde hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur (Zengin Ulakoğlu ve ark., 1998).

2.7. Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller, hücre zarındaki yağ asitleri ve kolestrolün doymamış bağları ile reaksiyona girerek peroksidasyona sebep olabilirler. Öncelikle yağ asidi, hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanarak lipid radikalini oluşturur. Oluşan lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksil radikalinin oluşmasını sağlar. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek hücrede zincirleme reaksiyon oluştururlar (Memişoğulları, 2005). Lipidlerin oksidasyonu, lipid peroksil radikali, lipid alkoksil radikali, alkil radikali, lipid aldehid gibi peroksidasyon ürünlerinin meydana gelmesini sağlar (Çelikezen ve Ertekin, 2008). Lipid peroksidasyonunu kantitatif olarak belirlemede kullanılan yöntemlerden biri, lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehitin (MDA), tiyobarbutirik asit ile ölçümüdür (Ohkawa ve ark., 1979).

2.8. Asetilkolinesteraz

Asetilkolin, sinir sistemindeki önemli nörotransmitterlerden biridir. Başta sinir ve kas dokusundaki eritrositlerde olmak üzere pek çok dokuda yaygın olarak bulunan bir enzim olan asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolini, kolin ve asetik aside hidroliz ederek sinir iletiminin bitirilmesini sağlayan bir glikoproteindir. AChE fonksiyonlarında oluşan kayıp, sinaptik aralıklarda asetilkolinin birikmesine neden olarak felç, nöbet ve ölüme sebep olur. (Tüylü Küçükkılınç, 2014; Uludağ, 2015). AChE enziminin inhibe edilmesi sonucunda, sinir kas kavşağında asetilkolin birikir ve sürekli etkin kalır. Bu durum postsinaptik sinir hücrelerinin sürekli depolarize olmasını sağlar. Özellikle organofosfatlı bileşikler, asetilkolinesterazın aktif bölümündeki serin

aminoasitine kovalent bağ ile bağlanarak AChE enzimini inhibe ederler (Uludağ, 2015).

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Lineer alkil benzen sülfonik asit

Çalışma kapsamında lineer alkil benzen sülfonik asit (LAS) Sigma Aldrich CAS No: 25155-30-0 kullanılmıştır

3.1.2. Zebra balığı embriyo eldesi

Tez çalışması kapsamında kullanılan zebra balığı embriyoları Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Balık Yetiştirme Laboratuvarı'nda elde edidi. Laboratuvar bünyesinde 50x23x20 cm boyutlarında akvaryumlar kuruldu. Akvaryumlar kloru giderilmiş çeşme suyu ile doldurulup içerisine ısıtıcılar yerleştirildi. Su sıcaklığının 28±1°C olması sağlandı. Akvaryum içerisindeki su hava motoru yardımıyla oksijenlendirildi. Üreme olgunluğuna erişmiş zebra balıkları yumurtlama akvaryumları içerisine 2 erkek: 1 dişi oranında yerleştirildi. Laboratuvar içerisinde zamanlayıcı kullanılarak 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ışık periyodu oluşturularak balıkların üremesi için gereken sirkadien ritm oluşturuldu. Işığın açılmasını takiben 15-20 dakika sonra elde edilen zebra balığı embriyoları toplandı. Ölü embriyolar ortamdan uzaklaştırılırken, yaşayan embriyoların gelişim evreleri ve sağlıklı gelişip gelişmedikleri stereo mikroskop altında gözlendi. Embriyolara LAS uygulaması segmentasyon aşamasında (yaklaşık 2,5. saat) yapıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. LC_{50} değerinin belirlenmesi

LAS'ın zebra balığı embriyolarında populasyonun yarısını öldüren letal konsantrasyonunun (LC_{50}) belirlenmesi için embriyolar kontrol ve doz gruplarına ayrıldı. Kontrol grubuna sadece akvaryum suyu, doz gruplarına ise sırasıyla 16 mg/L, 8 mg/L, 4 mg/L, 2 mg/L,1 mg/L, 0.5 mg/L, 0,25 mg/L, 0,125 mg/L LAS uygulaması yapıldı. 24, 48, 96 ve 12 saatlik LC_{50} konsantrasyonları SPSS 20.0 kullanılarak istatistiksel olarak hesaplandı. Belirlenen LC50 düzeylerine göre, toksisite deneylerini yapmak için zebra balığı embriyolarına 1mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L oranında LAS uygulaması yapıldı.

3.2.2. Toksisite analizleri

Kontrol ve LAS uygulaması (1mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L LAS) yapılmış embriyolar, segmentasyon aşamasında 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alındı. 5 gün boyunca embriyoların ölüm oranları, görülen gelişim anomalileri, koryondan çıkış zamanları ve oranları, pre-larvaların boy uzunlukları tespit edildi. Sonuçlar SPSS 20.0 kullanılarak istatistiksel olarak hesaplandı.

3.2.3. Histolojik analizler

Kontrol ve deney gruplarında (1mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L LAS) bulunan embriyolardan 60 gün boyunca örnekler alındı. Alınan örneklerin ışık mikroskobu altında incelenecek hale gelebilmesi için rutin histolojik işlemler uygulandı.

3.2.3.1. Fiksasyon

Alınan embriyolar Bouin fiksatifi içerisinde 24 saat boyunca tespit edildi (Tablo 3.1.)

Tablo 3.1. Işık mikroskobu için fiksasyon (tespit) uygulaması

Fiksatifin Adı	Fiksatifin İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı	Uygulama süresi
Bouin Fiksatifi	Suda doymuş pikrik asit	75 ml	2-24 saat
	%40 Formaldehit	25 ml	
	Glasiyal asetik asit	5 ml	

3.2.3.2. Dehidrasyon

Tespit işlemini takiben dokular konsantrasyonu artan alkol serilerinden geçirilerek içerisinde bulunan suyun uzaklaşması ve dokuya alkolün girmesi sağlandı (Tablo 3.2.)

Tablo 3.2. Dehidrasyon uygulaması

Solüsyon	Uygulama Süresi
%70 Etanol	30 dk
% 90 Etanol	30 dk
%95 Etanol	30dk
%100 Etanol	30dk

3.2.3.3. Şeffaflaştırma ve parafine gömme

Dokular, konsantrasyonu artan alkol serilerinden geçirildikten sonra 2 kez ksilolde 30'ar dakika bekletildi. Böylece dokudaki alkolün yerini ksilol ile değiştirmesi sağlandı. Ksilol uygulamasının hemen ardından dokular 58 ºC'lik etüvde sıvı parafin içerisinde 1 gece bekletildi. Ertesi gün embriyo ya da larvalar, kesit düzlemine göre parafin içerisine gömüldü.

3.2.3.4. Kesit alma

Parafin içerisine gömülen embriyo ve larvalardan Leica marka döner mikrotom kullanılarak 5 µm boyutunda kesitler alındı. Kesitler su banyosuna atıldıktan sonra albümin mayer sürülmüş lamların üzerine alındı ve kuruması beklendi.

3.2.3.5. Histolojik boyamalar

a) Best Carmin boyama yöntemi:

Bol miktarda glikojen taneleri içeren primordiyal germ hücreleri, Best Carmine boyası ile spesifik olarak boyandı. Best carmin boyasının hazırlanışı ve boyama yöntemi aşağıdaki gibidir (Tablo 3.3., Tablo 3.4.).

Tablo 3.3. Best Carmin boyasının hazırlanması

Best Carmin Stok Solüsyonu	**Madde adı**	**Miktarı**
	Carmine	2 g
	K_2CO_3	1 g
	Potasyum klorür	5 g
	Saf su	60 ml
Best Carmin Boyama Solüsyonu	**Madde adı**	**Miktarı**
	Stok solüsyon	10 ml
	%95 Etanol	15 m
	Amonyak	15 ml

Tablo 3.4. Best Carmin boyama yöntemi

1	Ksilol	10 dk.
2	Ksilol	10 dk.
3	%100 etanol	10 dk.
4	Etanol:Eter (1:1)	15 dk.
5	Lamları dik süz	
6	Musluk suyunda akıt	1-2 dk.
7	Hematoksilen boyama	5 dk.
8	Akansu altında	30 sn
9	Best Carmin boyama solüsyonu	20 dk.
10	Metanol	3 x 10 dk.
11	Aseton	3 x 10 dk
12	Aseton:Ksilol (1:1)	10 dk.
13	Ksilol	10 dk.
14	Ksilol	10 dk.
15	Entallan ile kapama	

b) Toluidin Blue boyama yöntemi

Primordiyal germ hücreleri, içerdikleri elektronca yoğun materyal (nuage materyali) sayesinde Toluidin Blue boyası ile spesifik bir şekilde boyandı ve ışık mikroskobu altında kolayca teşhis edildi. Toluidin blue boyama yöntemi aşağıdaki gibidir (Tablo 3.5., Tablo 3.6.).

Tablo 3.5. Toluidin blue boyasının hazırlanışı yöntemi

Periyodik Asit Solüsyonu	**Madde Adı**	**Miktarı**
	Periyodik Asit	1 g
	% 90 Etil Alkol	100 ml

Tablo 3.6. Toluidin blue boyama yöntemi

1	Ksilol	5 dk.
2	%100 etanol	2dk
3	%95 etanol	2dk
4	%70 etanol	2dk
5	Distile su	30 sn
6	Toluidin blue (0.5g/L)	2 sn
7	Distile su	4 dk
8	%70 etanol	2dk
9	%95 etanol	2dk
10	%100 etanol	2dk
11	Ksilol	2 dk
12	Entellan ile kapama	

c) Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama yöntemi

PAS, dokudaki polisakkaritleri tespit etmek amacıyla kullanılan bir boyadır. Primordiyal germ hücreleri, glikojence zengin olduklarından PAS boyası ile spesifik olarak boyanırlar. PAS boyasının hazırlanışı ve boyama yöntemi aşağıdaki gibidir (Tablo 3.7., Tablo 3.8).

Tablo 3.7. Periyodik Asit Solüsyonunun Hazırlanışı

Periyodik Asit Solüsyonu	**Madde Adı**	**Miktarı**
	Periyodik Asit	1 g
	% 90 Etil Alkol	100 ml

Tablo 3.8. Periyodik Asit Schiff Boyama Protokolü

1	Ksilol	10 dk
2	Ksilol	10 dk
3	%100 Etanol	10 dk
4	Periyodik Asit	2 saat
5	%90 Etanol	5 dk
6	Sudan Geçir	
7	Schiff Ayracı	10 dk
8	Sülfit Solüsyonu	5 dk
9	Akarsu altında	5 dk
10	Hematoksilen ile zıt boyama	3 dk
11	%96 Etanol	3 dk
12	%100 Etanol	3 dk
13	%100 Etanol	3 dk
14	Ksilol	10 dk
15	Ksilol	10 dk
16	Kapama	

d) Alkalin Fosfataz boyama yöntemi

Primordiyal germ hücreleri alkalin fosfataz enzim aktivitesine sahiptir. Bu enzim adından da anlaşılabileceği gibi alkali pH da substratını defosforile eden enzimdir. Bu yüzden, alkalin fosfataz boyası primordiyal germ hücrelerini spesifik olarak boyamaktadır. Alkalin fosfataz boyama protokolü aşağıdaki gibidir (Tablo 3.9.).

Tablo 3.9. Alkalin Fosfataz Boyama Yöntemi

1	Ksilol	10 dk
2	%100 Etanol	10 dk
3	%96 Etanol	10 dk
4	%90 Etanol	10 dk
5	%70 Etanol	10 dk
6	Saf su	5 dk
7	İnkübasyon solüsyonu (37 ºC lik etüvde)	2 saat
8	Oda sıcaklığında soğutma	30 dk
9	%2'lik $CaCl_2$	1 dk
10	%2'lik $CoCl_2$	5 dk
11	Saf su	30 sn
12	Amonyum sülfür	1 dk
13	Çeşme suyunda yıkama	30 dk
14	%70 Etanol	10 dk
15	%90 Etanol	10 dk
16	%96 Etanol	10 dk
17	%100 Etanol	10 dk
18	Ksilol	10 dk
19	Entellan ile kapama	

3.2.4. Akridin turuncusu boyaması

Koryonlarından çıkarılan zebra balığı embriyoları petri içerisindeki yaşama ortamına alındı. Daha sonra akridin turuncusu boyası, (Sigma) 5 µg akridin turuncusu / ml akvaryum suyu olacak şekilde embriyo ortamına eklendi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. Embriyolar akridin turuncusu içerisinde 30 dk boyunca bekletildi. Boyamadan sonra embriyolar %4'lük 3-amino benzoik asit metilester içerisinde anestezi edildi ve ölü hücreler florasan mikroskop ile fotoğraflandı.

3.2.5. TUNEL yöntemi

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi, Milipore Apoptag Peroxidase in situ Apoptosis Kit- S7100 kullanılarak yapılmıştır. TUNEL, Apoptozun en önemli belirtilerinden biri olan DNA'nın kırık ucundaki 3'OH grubuna dUTP bağlanarak apoptotik hücrelerin tanımlanmasına yönelik bir yöntemdir. Bu yöntemle hücrede DNA'daki tek ve çift zincir kırıklarının yanı sıra kromatin kondensasyonu ile başlayan erken evre apoptoz da tespit edilebilmektedir. TUNEL tekniğinin uygulanışı aşağıdaki gibidir:

- Embriyolar %4'lük paraformaldehit içerisinde 1 gece boyunca +4 ºC'de fikse edildi.
- Embriyolar PBS ile yıkanır. Proteinaz K ile muamele edildikten sonra 4 dk 2 mg/ml glisin içerisinde tutuldu.
- %4'lük paraformaldehit içerisinde 20 dk bekletilerek yeniden fikse edildi.
-Embriyolar 3 x 5 dk PBS ile yıkandı.
-Embriyolar etanol:asetik (2:1 v/v) asit içerisinde 15 dakika bekletildi.
-Kit içerisinde bulunan dengeleme tamponu, TdT enzim solüsyonu ve durdurma tamponu ile muamele edildi.
-Anti-DIG-AP antikor uygulaması yapıldı.
-Substrat ile boyanarak embriyolar ışık mikroskobu altında incelendi. Kahverengi renge boyanan apoptotik hücreler diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edildi. Kontrol ve deney grubuna ait embriyolardaki (n=15) apoptotik hücreler sayılarak kontrol ve deney gruplarındaki apoptotik hücre indeksi istatistiksel yöntemlerle belirlendi.

3.2.6. Biyokimyasal analizler

3.2.6.1. %10'luk embriyo homojenatının hazırlanması

Biyokimyasal analizler, kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük larvalar (n= 100) kullanılarak yapıldı. Larvalar, homojenat çözeltisi (Tablo 3.10.) ile homojenize edildi (Şekil 3.1.). Elde edilen homojenat 12,000 rpm'de 4ºC'de 20 dk santrifüj edildi.

Tablo 3.10. Homojenat tamponunun hazırlanması

Na_2HPO_4	0.356 g
Sükroz	8.25 g
Total hacim 100 ml'ye tamamlanır. pH 8'e ayarlanır.	



Şekil 3.1. Embriyoların homojenize edilmesi

3.2.6.2. Toplam protein miktarının belirlenmesi

Bradford yöntemi ile total protein tayini, Coomassie Brillant Blue (G-250) boyasının proteinlere bağlanması sonucunda 595 nm'de absorbanslarının ölçülmesine dayanan bir yöntemdir (Bradford, 1976).

-Standart çözeltilerin hazırlanması içn 0,1 g/L lik albümin stok çözeltisinden %20, 40, 60, 80 oranında seyreltilmiş 4 standart çözelti hazırlandı.
- Kör, standart ve numune tüpleri oluşturularak aşağıdaki şekilde çalışıldı (Tablo 3.11.)

Tablo 3.11. Bradford Yöntemine Göre Embriyolarda Protein Tayini

	Numune	S1	S2	S3	S4	Kör
Albumin (0.1 g/L)	-	20 µl	40 µl	60 µl	80 µl	-
Doku homojenatı	25 µl	-	-	-	-	-
Distile su	775 µl	780 µl	760 µl	740 µl	720 µl	800 µl
	VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR					
Bradford Reaktifi	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
	VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR					

Oda sıcaklığında 15 dk beklendikten sonra 595 nm'de köre karşı absorbanslar ölçüldü. Protein standart grafiği ile toplam protein miktarı hesaplandı.

3.2.6.3. Malondialdehit (MDA) miktarının belirlenmesi

Hücrede lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile tepkimesi sonucu oluşan ürünün absorbansının spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanan yöntemdir (Ledwozyw ve ark., 1986). Kör ve numune tüpleri oluşturularak aşağıdaki şekilde çalışıldı (Tablo 3.12.).

Tablo 3.12. Ledwozyw Yöntemi ile Embriyolarda MDA Yöntemi

	Numune	Kör
Doku homojenatı	0.25 ml	-
Distile su	-	0.25 ml
Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M)	1.25 ml	1.25 ml
VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR VE 15 DK BEKLENİR.		
Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi (0.047 M)	0.75 ml	0.75 ml
VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR VE 30 DK. KAYNAR SU BANYOSUNDA BEKLETİLİR.		
n-Bütanol	2 ml	2 ml

Her tüp vortekslendikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Ayrışan bütanol fazı alınarak 532 nm'de köre karşı absorbanslar ölçüldü. Sonuçlar, doku homojenatındaki MDA için belirlenmiş ekstinksiyon katsayısı ($1.56.x10^5$ $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak nmol MDA/ mg protein olarak hesaplandı.

3.2.6.4. İndirgenmiş glutatyon (GSH) miktarının belirlenmesi

Sülfidril grupları ile Ellman Ayracı'nın (DTNB; 5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) reaksiyonu sonucu oluşan ürünün 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümüne dayalı bir yöntemdir (Beutler, 1975). Gerekli çözeltiler Tablo 3.13.'de verilmiştir.

Tablo 3.13. GSH tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltinin Adı	İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı
Sodyum sitrat çözeltisi	Sodyum sitrat	1g
	Distile su	100 ml
Ellman Ayracı	DNTB	40 mg
	%1'lik sodyum sitrat çözeltisi	100 ml
Proteinsizleştirme Çözeltisi	Metafosforik asit	1,67g
	EDTA-Na	0.2 g
	NaCl	30g
	Distile su	100 ml
Disodyum fosfat Çözeltisi	Na_2HPO_4	4,26 g
	Distile su	100 ml

Her bir numune için tüplere 0,2 ml doku homojenatı ve 0,3 ml proteinsizleştirme çözeltisi eklendi. Tüpler vorteks ile karıştırılıp 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı. Kör ve numune tüpler oluşturuldu ve aşağıdaki gibi çalışıldı (Tablo 3.14.).

Tablo 3.14. Beutler yöntemine göre GSH tayini

	Numune	Kör
Distile su	-	0,2 ml
Süpernatant	0,2 ml	-
Disodyum fosfat çözeltisi	0,8 ml	0,8 ml
Ellman Ayracı	0,1 ml	0,1 ml
VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR		

Oda sıcaklığında 5 dk beklendikten sonra 412 nm'de köre karşı absorbanslar kaydedildi. GSH, ekstinksiyon katsayısı (13600/ $M^{-1}cm^{-1}$) kullanılarak GSH µg/mg protein olarak hesaplandı.

3.2.6.5. Katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz enzimi H_2O_2'nin H_2O ve O_2'ye dönüşümünü katalizler. Bu dönüşüm, 1 dakikada 240 nm'deki absorbansın azalması ile izlenir (Aebi, 1974). Çözeltilerin hazırlanış şekli Tablo 3.15.'de verilmiştir.

Tablo 3.15. CAT tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltinin Adı	İçerdiği Maddeler	Hazırlanışı
Fosfat Tamponu (50 mM)	KH_2PO_4 (6,81 g/L)	1 hacim
	$Na_2HPO_4.2H_2O$ (8.90 g/L)	1,5 hacim
H_2O_2 çözeltisi+Fosfat Tamponu	%30'luk H_2O_2 çözeltisi	0,31 ml
	50 mM lık fosfat tamponu	Son hacim 100 ml ye tamamlanır.

Doku homojenatı 1/10, 1/20, 1/50 oranında serum fizyolojik ile seyreltildi. Seyreltme işlemi yapıldıktan sonra 5-10 dk içinde çalışıldı. Kör ve numune tüpleri oluşturularak Aebi metodu aşağıdaki gibi uygulandı (Tablo 3.16.).

Tablo 3.16. CAT tayini için çözeltilerin hazırlanışı

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu	-	0.2 ml
Seyreltilmiş Homojenat	0.4 ml	0.4 ml
H_2O_2 çözeltisi+Fosfat Tamponu	0.2 ml	-

240 nm'de absorbanslar köre karşı okunarak kaydedildi. Ekstinksiyon katsayısı 0,004 (0,00394) mM^{-1}/mm^{-1} kullanılarak ve yapılan seyreltmeler göz önüne alınarak sonuçlar hesaplandı. U/mg protein dk cinsinden hesaplama yapıldı.

3.2.6.6. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi

Asetilkolin esteraz enzimi dokularda asetilkolini inhibe eden enzimdir. Çözeltilerin hazırlanışı (Tablo 3.17.) ve deneyin yapılışı (Tablo 3.18.) aşağıda verilmiştir (Ellman ve ark., 1961).

Tablo 3.17. AChE tayini için gerekli çözeltiler

Çözeltinin Adı	İçerdiği Maddeler	Madde Miktarı	Hazırlanışı
DTNB Belirteci	Sodyum fosfat NaHCO3 DTNB	8,75 g 1,5 g 3,96 g	Kimyasallar bir miktar su içerisinde çözülerek son hacim 1L ye tamamlanır. (pH=7)
Sodyum Tamponu	Sodyum fosfatdihidrat	8,75 g	Bir miktar suda çözülür. NaOH çözeltisi (1N) ile pH 8 e ayarlanır. Son hacim 1 L ye tamamlanır.
Asetilkolin iyodür	Asetilkolin iyodür	0,50868 g	0.05 M'lık sodyum fosfat tamponunda çözülür. Son hacim 100 ml ye tamamlanır.

Deney her numunenin kendi körü olacak şekilde yapıldı.

Tablo 3.18. Ellman yöntemine göre AChE tayini

	Numune	**Kör**
DNTB Belirteci	100 µl	100 µl
Doku Homojenatı	100 µl	100 µl
VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR VE SADECE KÖR 65ºC'DE 3 DK. BEKLETİLİR		
Sodyum Tamponu	2,7 ml	2,7 ml
VORTEKS İLE KARIŞTIRILIR ve 37 ºC'DE 5 DK. BEKLETİLİR.		
Asetilkolin İyodür	100 µl	100 µl
37 ºC'DE 10 DK BEKLENİR.		

Absorbans değerleri 412 nm'de ölçüldü.

3.2.7. İstatistiksel analizler

Tüm istatistiksel analizler SPSS 20.0 programı kullanılarak yapıldı. Embriyoların 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik LC_{50} dozlarının belirlenmesi için Probit analizi uygulandı. Diğer tüm analizlerde ANOVA testi kullanılarak istatistiksel anlamlılık tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan grupların aralarındaki ilişki ise ANOVA Post Hoc testlerinden Tukey HSD testi yapılarak incelendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

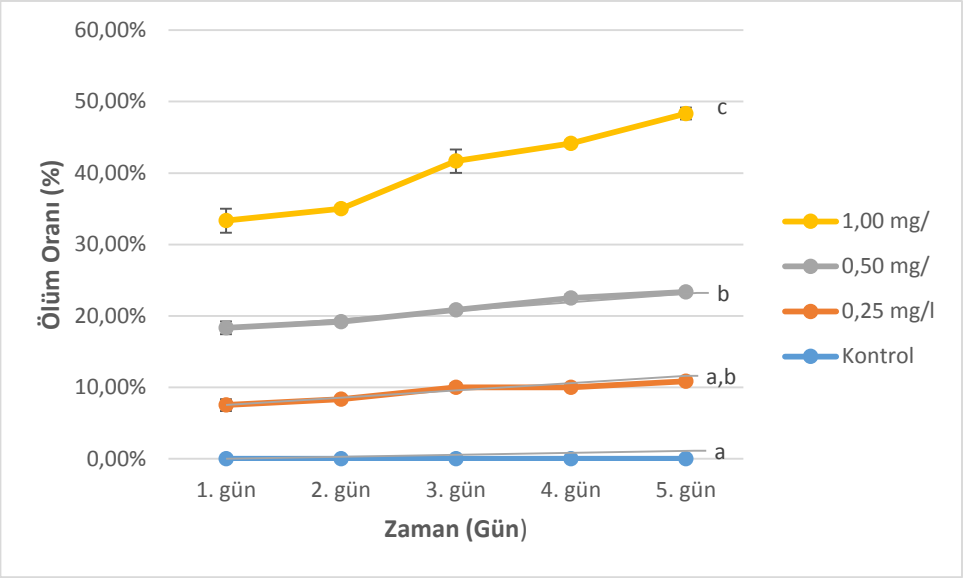
4.1. LC_{50} Değerinin Hesaplanması

LAS uygulaması yapılan zebra balığı embriyo ve prelarvalarında SPSS 20.0 programı kullanılarak yapılan Probit analizleri sonucunda LC_{50} değerleri, 24 saat için 5,769 ± 0,791, 48 saat için 4,769 ± 0,759, 96 saat için 2,306 ± 1,037 ve 120 saat için 2,095 ± 0,955 mg/L olarak tespit edildi. Elde edilen LC_{50} değerleri göz önüne alınarak çalışma süresince uygulanacak dozlar 1 mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L olarak belirlendi.

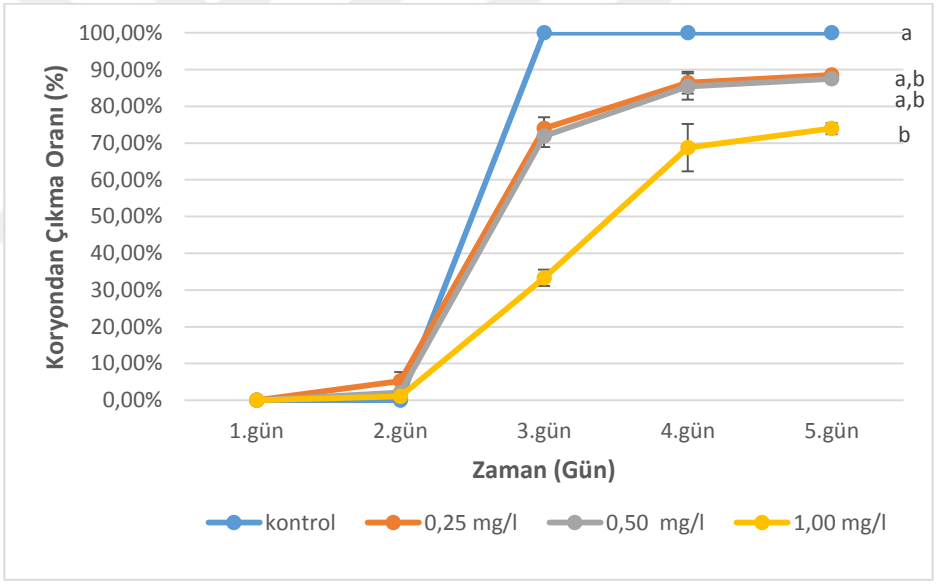
4.2. Gelişim Toksisitesi Analizleri

Segmentasyon aşamasında 24 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınan kontrol ve doz grubuna (1mg/L, 0,5 mg/L ve 0,25 mg/L LAS) ait embriyoların ölüm oranları, gelişimleri, boy uzunlukları ve koryondan çıkış zamanları invert mikroskop altında 5 gün boyunca takip edildi. Kontrol grubuna kıyasla embriyo ölüm oranlarında 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta minimum düzeyde fark görüldü. 0,5 ve 1 mg/L LAS uygulaması yapılan gruplarda doz artışına bağlı olarak ölüm oranında artış tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması yapılan grupta anlamlı düzeyde artış belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.1.).

Zebra balığı embriyolarının kontrol ve deney gruplarında koryondan çıkış oranları izlendiğinde, gelişimin 3. gününden itibaren koryondan çıkmaya başladıkları ve prelarva olarak suda serbest halde yüzdükleri görüldü. Deney grupları kontrol grupları ile kıyaslandığında 0,25 ve 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış embriyolarda koryondan çıkış oranında minimal düzeyde azalma tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta ise kontrol grubuna kıyasla koryondan çıkış süresinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.2.).

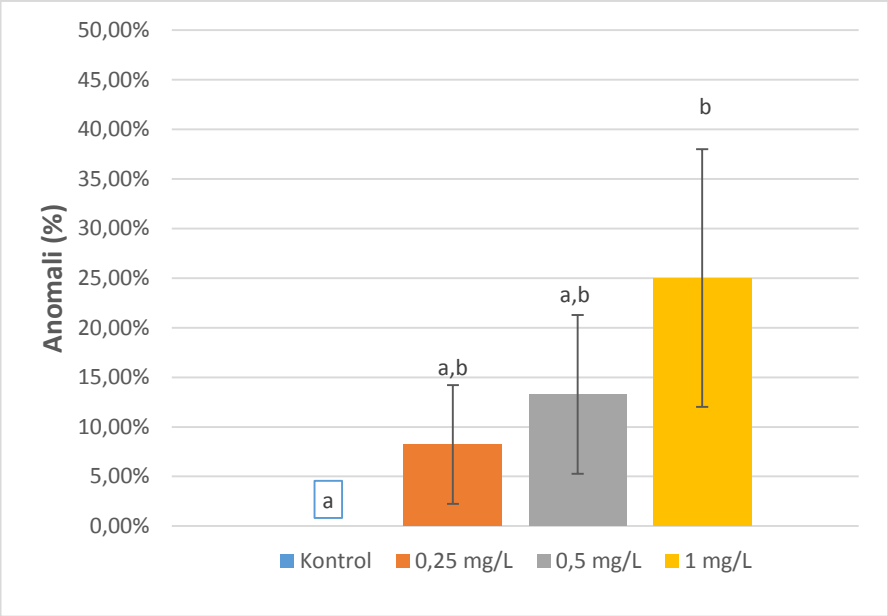


Şekil 4.1. LAS uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarında ölüm oranları ($p<0,05$)



Şekil 4.2. LAS uygulaması sonucu zebra balığı embriyolarında koryondan çıkma oranı ($p<0,05$)

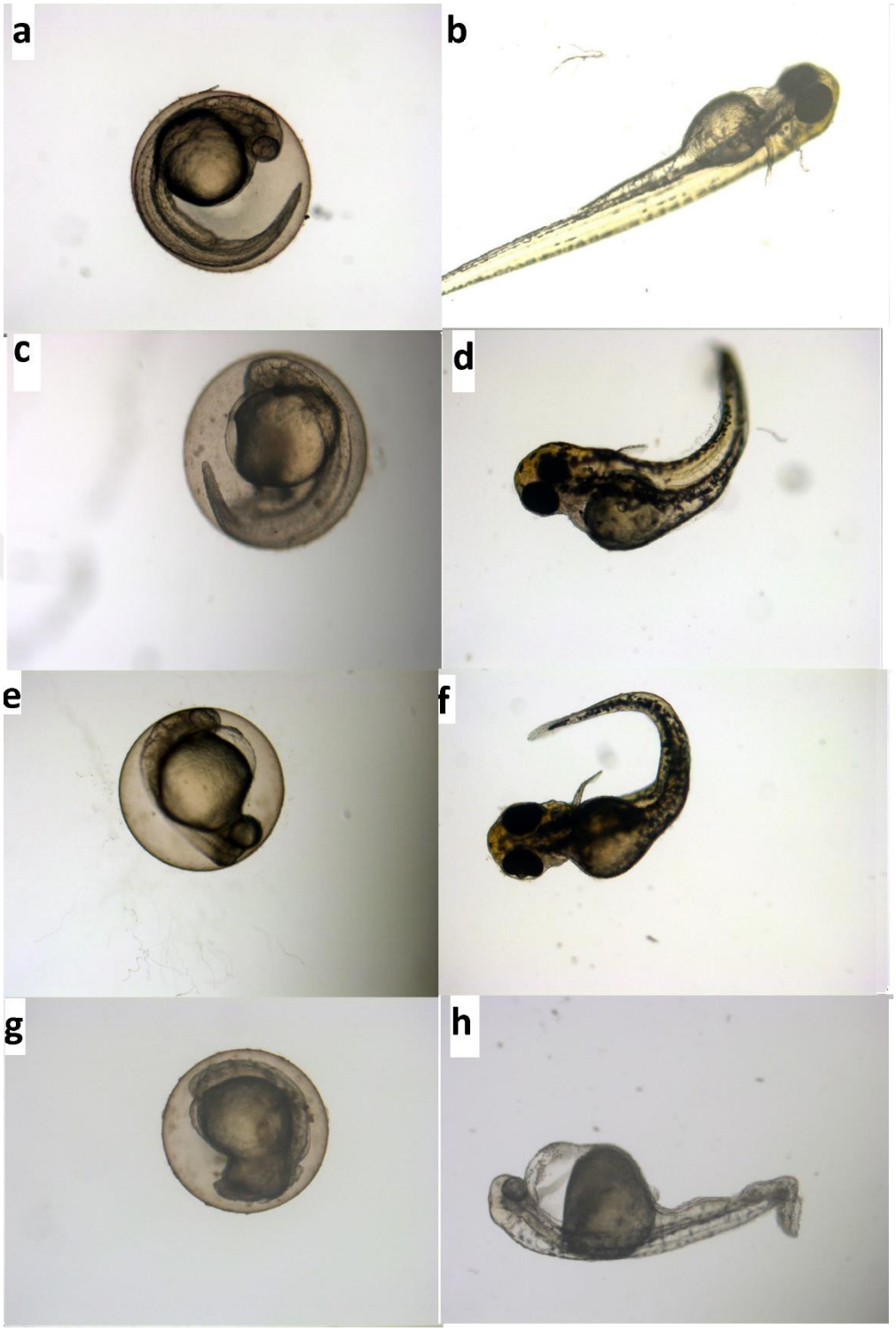
Kontrol ve deney grubuna ait embriyoların gelişimleri 5 gün boyunca invert mikroskop altında izlendi. Normal ve anormal gelişen embriyoların sayıları not edildi. Kontrol grubunda anormal gelişen embriyoya rastlanmazken, 0,25 ve 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılan gruptaki embriyolarda minimal düzeyde anormal gelişim tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir şekilde anormal gelişime sebep olduğu tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.3.).



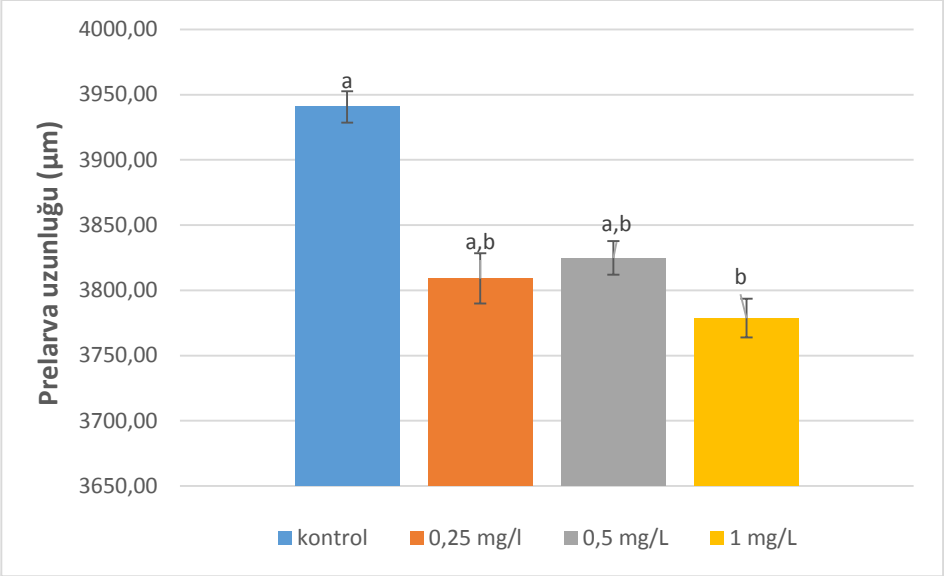
Şekil 4.3. LAS uygulaması sonucunda zebra balığı embriyolarında görülen anomali oranı

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta omurga eğriliği ve vitellüs kesesi ödemi görüldü. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta perikardiyal ödem, vitellüs kesesi ödemi ve omurga eğriliği tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta, diğer gruplara göre daha ciddi anomaliler tespit edildi. Perikardiyal ödem, kuyruk yapısında ve omurgada eğrilik, vitellüs kesesi ödemi, ve vitellüs kesesinde yayılma görüntülendi ($p<0,05$) (Şekil 4.4.).

Gelişimin 5. gününde kontrol ve deney grubuna ait prelarvaların boyları ölçüldü. Kontrol grubuna kıyasla, 0,25 ve 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılan gruptaki prelarvalarda minimal düzeyde kısalma görülürken, 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış gruptaki embriyoların boylarında belirgin biçimde kısalma tespit edildi ($p<0,05$) (Şekil 4.5.).



Şekil 4.4. Kontrol ve doz grubuna ait zebra balığı embriyolarında görülen anomaliler. a: kontrol grubu 1. gün, b) Kontrol grubu 3. gün, c) 0,25 mg/L LAS grubu 1. gün, perikardiyal ödem ve vitellüs kesesi ödemi d) 0,25 mg/L LAS grubu 3. gün, omurga eğriliği, e) 0,5 mg/L LAS grubu 1. gün, perikardiyal ödem ve vitellüs kesesi ödemi, f) 0,5 mg/L LAS grubu 3. gün, omurga eğriliği, g) 1 mg/L LAS grubu, 1. gün, perikardiyal ödem, vitellüs kesesinde büyüme, h) 1 mg/L LAS grubu, 3. gün, perikardiyal ödem, vitellüs kesesi ödemi ve kuyrukta eğrilik.

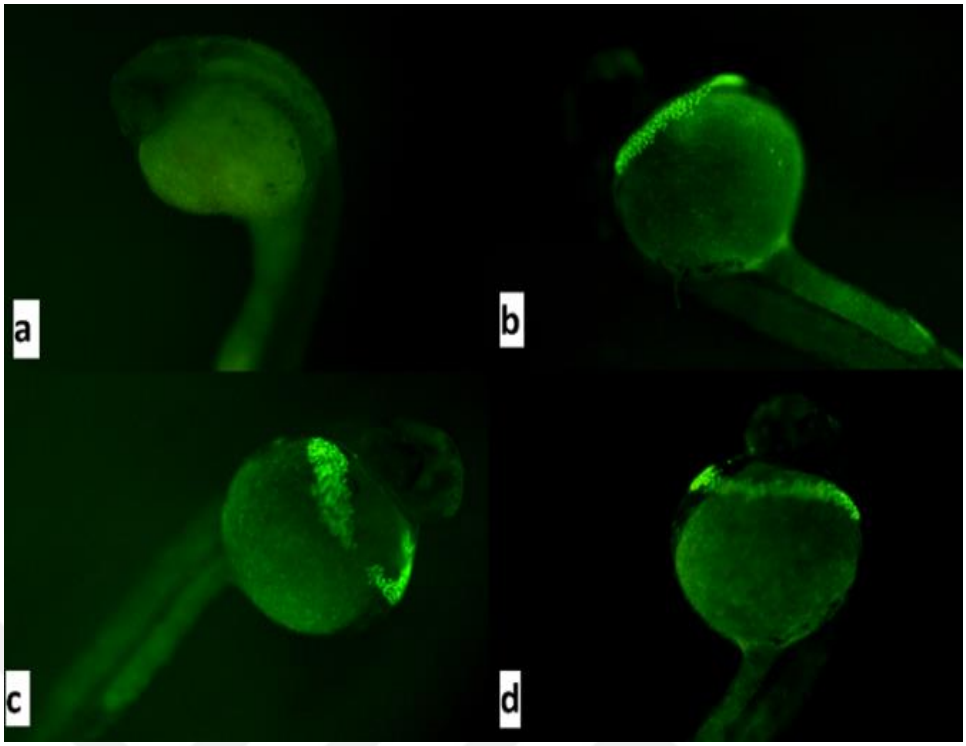


Şekil 4.5. 5 günlük LAS uygulaması sonucunda zebra balığı prelarvalarının boy uzunlukları

4.3. Akridin Turuncusu Boyaması

Akridin turuncusu (3,6-dimetilaminoakridin), hücreler tarafından kolayca emilen ve nükleik asitlere bağlanan vital ve metakromotik bir boyadır. Akridin turuncusu, canlı dokuda hücre ölümünü gözlemek için kullanılmaktadır. TUNEL (Terminal dUTP Nick End-Labeling) tekniği ile kıyaslandığında akridin turuncusu boyaması hızlı bir işlem olduğundan dolayı daha avantajlıdır.

Kontrol ve deney grubuna ait 1 günlük zebra balığı embriyoları koryonlarından çıkarıldıktan sonra akridin turuncusu boyasına 30 dk boyunca maruz bırakıldı. Akridin turuncusu boyaması sonrasında ölü hücreler floresan mikroskop altında parlak yeşil renkte gözlendi. Kontrol grubunda hücre ölümü gözlenmezken LAS uygulaması yapılmış embriyoların vitellüs kesesinde çok sayıda ölü hücreye rastlandı (Şekil 4.6.).

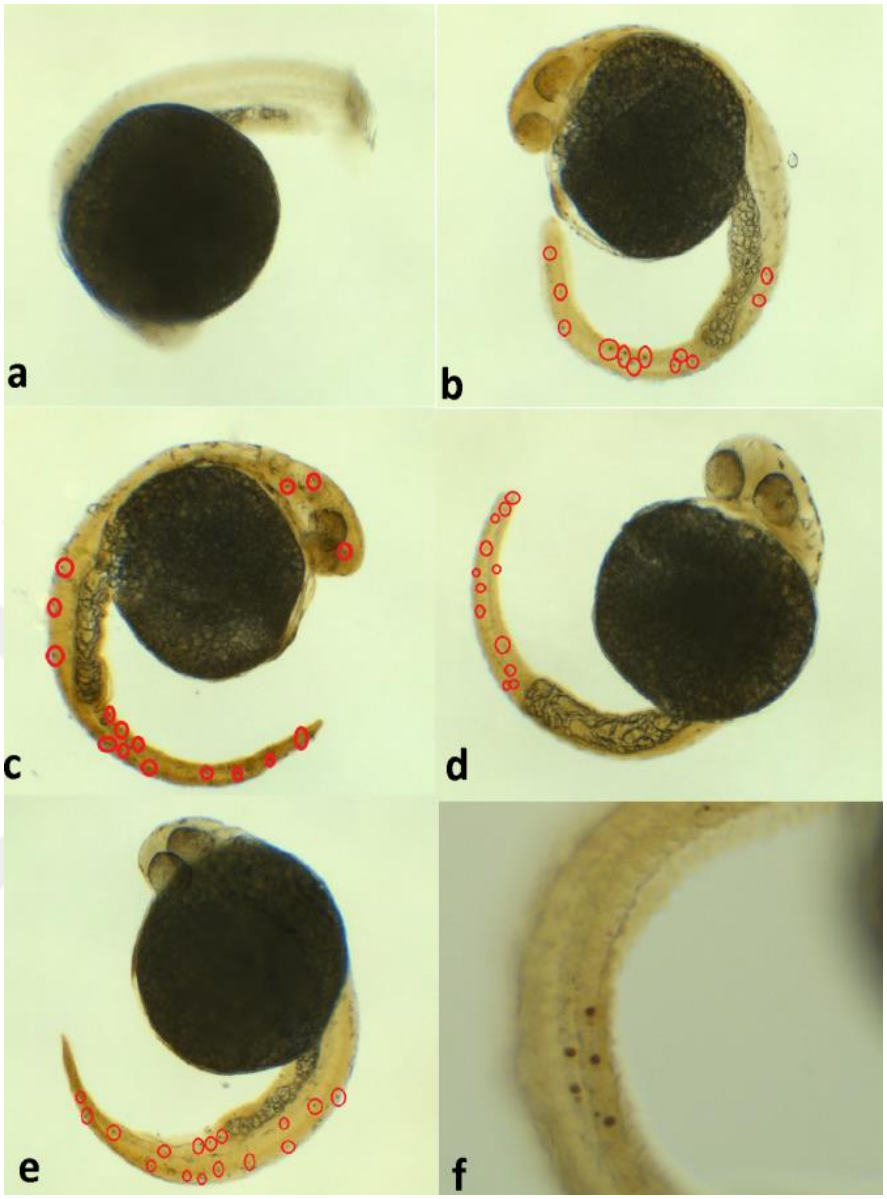


Şekil 4.6. 24 saatlik zebra balığı embriyolarında akridin turuncusu boyaması. a) Kontrol grubu, b) 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, c) 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, d) 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup

4.4. TUNEL Analizi

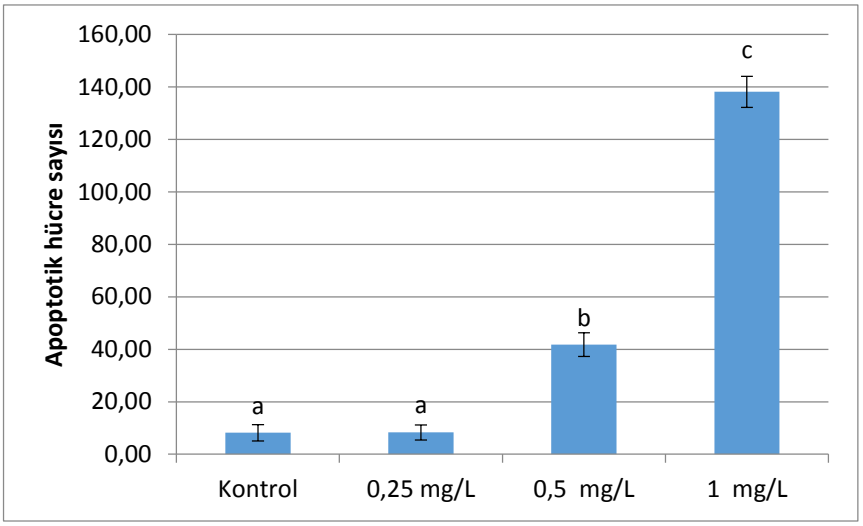
Programlı hücre ölümü olan apoptozu tespit etmede en çok kullanılan yöntemlerden biri TUNEL analizidir. TUNEL tekniği ile akridin turuncusu boyaması arasında önemli farklar bulunmaktadır. Akridin turuncusu çift zincir DNA'ya bağlanıp hücrenin yeşil floresan renkte gözükmesini sağlar. TUNEL tekniğinde, apoptotik hücrelerdeki endonükleazlar tarafından oluşturulan DNA kırıkları spesifik olarak kahverengiye boyanır. Yani akridin turuncusu lizozomal aktivitenin yoğun olduğu ölü hücreleri, TUNEL ise apoptotik ölü hücreleri spesifik olarak boyar.

Deney kapsamında negatif kontrol, kontrol ve deney grupları (0,25 mg/L, 0,5 mg/L ve 1mg/L LAS) oluşturuldu. TUNEL analizi sonucunda negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon oluşmazken, kontrol ve deney grubunda reaksiyon oluşumu tespit edildi. TUNEL analizi sonucunda kahverengi renkteki apoptotik hücreler, ışık mikroskobu altında görüntülendi. Embriyolarda baş ve kuyruk kısımlarında apoptotik hücreler tespit edildi (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. 24 saatlik zebra balığı embriyolarında TUNEL analizi. Kahverengi hücreler apoptotik hücreler olup kırmızı yuvarlaklar ile işaretlenmiştir. a) Negatif kontrol, b) Kontrol grubu, c) 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, d) 0,50 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, e) 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, f) 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, apoptotik hücrelerin büyültülmüş hali.

Kontrol ve deney gruplarında bulunan embriyolardaki apoptotik hücreler sayılarak not edildi ve istatistiksel yöntemlerle kontrol ve deney grupları arasındaki farklar ortaya konuldu. Kontrol grubuna kıyasla 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılan grupta apoptotik hücre sayısı artmazken, 0,5 ve 1 mg/L LAS uygulaması yapılan grupta belirgin bir artış gözlendi ($p<0,01$) (Şekil 4.8.).

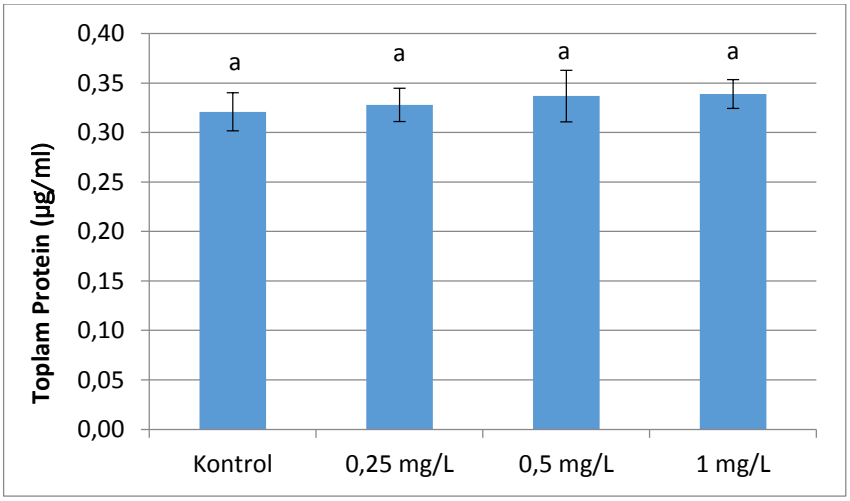


Şekil 4.8. Kontrol ve deney grubuna ait 24 saatlik zebra balığı embriyolarındaki apoptotik hücre sayıları

4.5. Biyokimyasal Analizler

4.5.1. Toplam protein miktarı

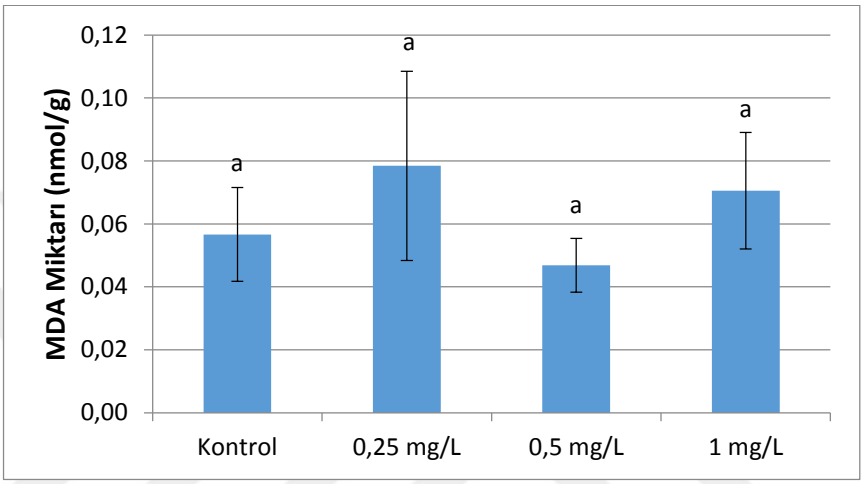
7 günlük zebra balığı larvalarında kontrol ve LAS uygulaması yapılmış deney gruplarına ait total protein miktarları tespit edildi (Şekil 4.9.). Yapılan analizlere göre kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Çeşitli konsantrasyonlarda (0,25, 0,5 ve 1 mg/L) LAS uygulamasının, 7 günlük zebra balığı larvalarında protein miktarında değişim oluşturmadığı görüldü.



Şekil 4.9. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki toplam protein miktarı

4.5.2. Lipid peroksidasyonu

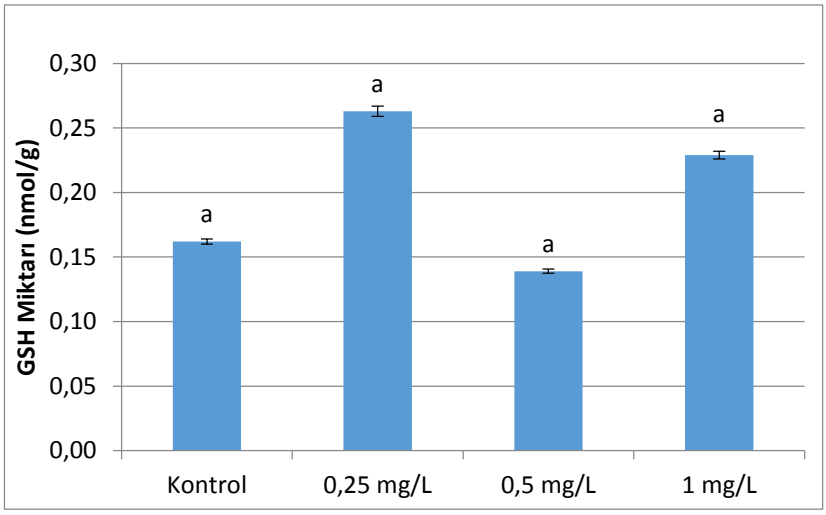
Gelişimin 7. gününde LAS uygulamasının oksidatif strese neden olup olmadığını anlamak için kontrol ve deney gruplarına ait larvalarda lipid peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarlarına bakıldı. MDA analizleri sonucunda kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 4.10.).



Şekil 4.10. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki MDA miktarı

4.5.3. İndirgenmiş glutatyon (GSH) miktarı

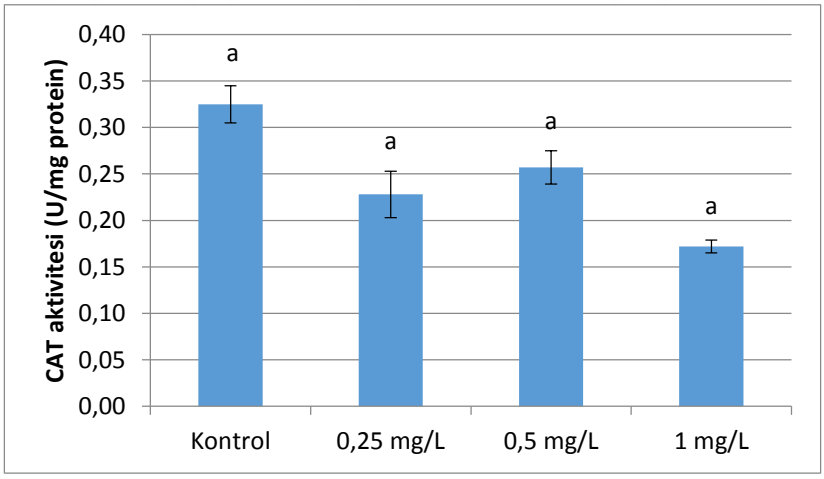
Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki indirgenmiş glutatyon (GSH) seviyeleri tespit edildi (Şekil 4.11.). Kontrol ve deney grupları arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.11. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki GSH miktarı

4.5.4. Katalaz (CAT) aktivitesi

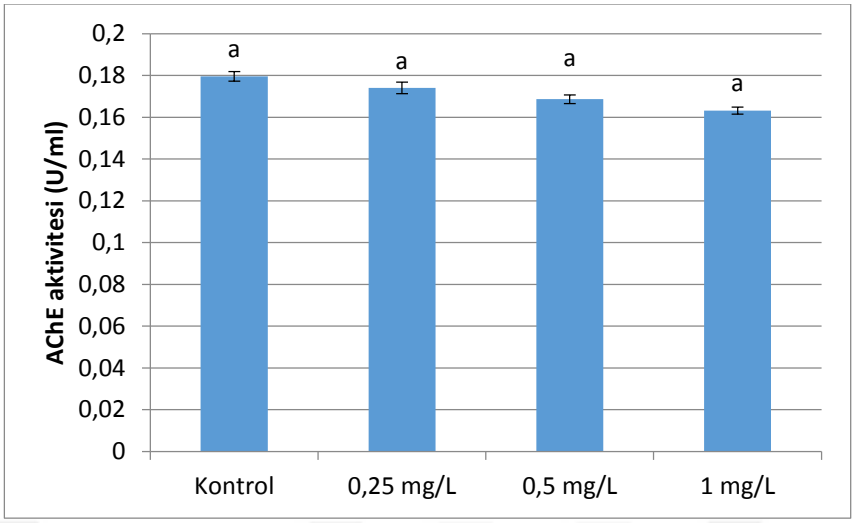
Gelişimin 7. gününde kontrol ve deney gruplarına ait zebra balığı larvalarındaki CAT miktarları ölçüldü (Şekil 4.12.). Kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.



Şekil 4.12. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki CAT miktarı

4.5.5. Asetilkolinesteraz aktivitesi

Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi tespit edildi (Şekil 4.13.). Kontrol ve deney grupları arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 4.13. Kontrol ve deney grubuna ait 7 günlük zebra balığı larvalarındaki AChE miktarı (U/ml)

4.6. Histolojik Analizler

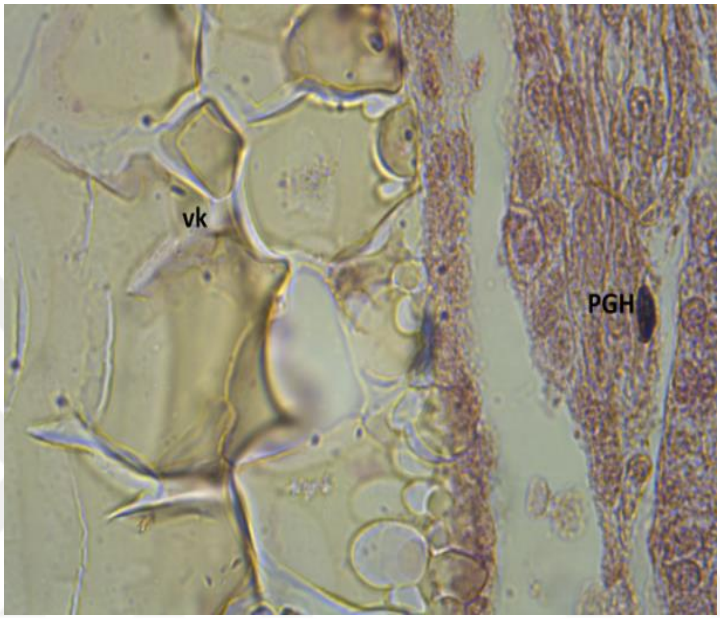
Kontrol ve LAS uygulaması yapılan gruplarda, zebra balığı embriyo ve larvalarından 60 gün boyunca örnekler alınarak rutin histolojik işlemler uygulandı. Primordiyal germ hücrelerinin morfolojileri, konumları ve göç yolları bu hücreler ile pozitif reaksiyon veren Best Carmin, Alkalin Fosfataz, PAS ve Toluidin mavisi boyamaları yapılarak tespit edildi. Bunun yanı sıra gonad taslaklarının oluşma ve olgun bir gonad yapısına farklılaşma süreci kontrol ve deney gruplarında izlendi.

4.6.1. Kontrol grubu

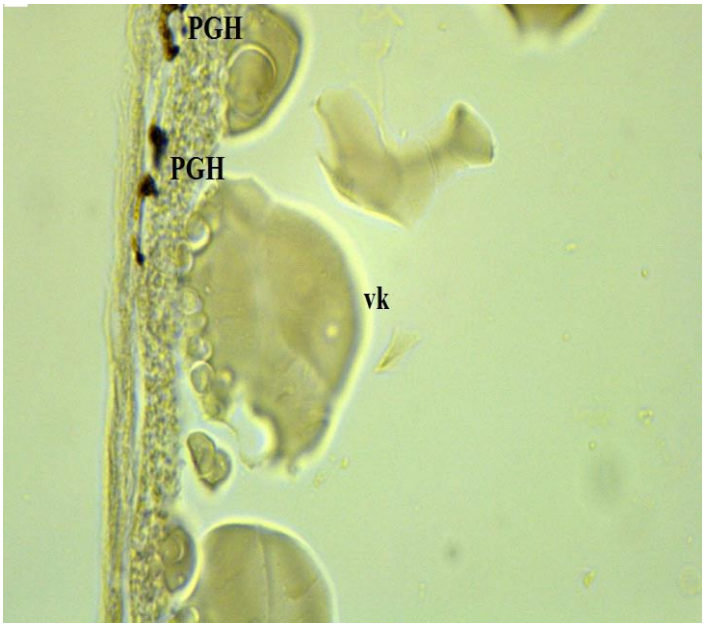
Kontrol grubuna ait örneklerde primordiyal germ hücreleri gelişimin 1. gününden itibaren tespit edilip göç yolları izlenmeye başlandı. Gelişimin 1. gününde vitellüs kesesi ile kas dokusu arasında konumlanan primordiyal germ hücrelerinin gelişim boyunca solungaç, kalp, karaciğer, özafagus, ince barsak hattından ilerleyerek son olarak gonad taslaklarına ulaştığı incelenen kesitlerde tespit edildi. Gonad taslaklarına ulaşan primordiyal germ hücrelerinin, burada mitoz bölünme geçirdikleri ve spermatogonyum ya da oogonyumları oluşturmak üzere farklılaştığı görüldü. Gelişimin ileri safhasında bazofilik sitoplazmaya sahip bu hücrelerde mayoz bölünme faaliyetlerinin başladığı tespit edildi. Mayoz bölünme geçiren hücrelerin tip 1 ve tip 2

germ hücrelerine farklılaştıktan sonra ovaryum veya testis yapısına dönüştükleri görüntülendi.

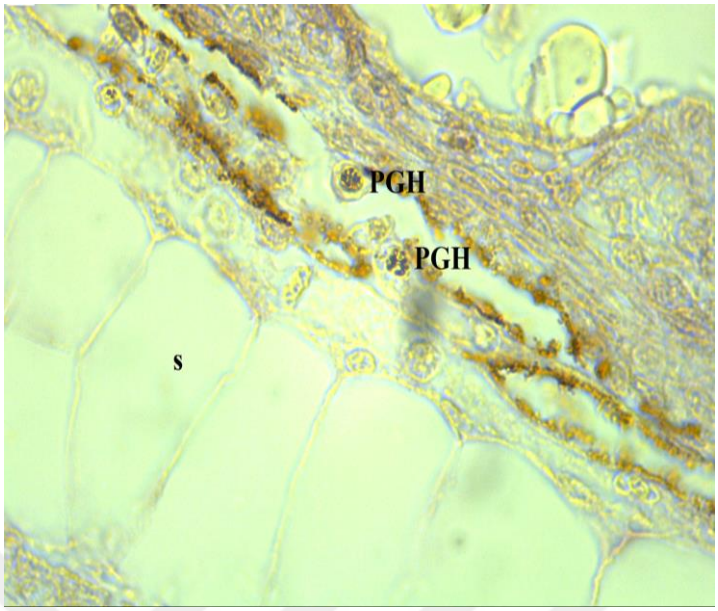
Kontrol grubunda gelişimin 1. (Şekil 4.14.) ve 2. gününde (Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.) primordiyal germ hücrelerinin vitellus kesesinin dorsalinde yer aldığı tespit edildi.



Şekil 4.14. Kontrol grubu,1 günde görülen primordiyal germ hücresi. vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, Best Carmine boyama, x100

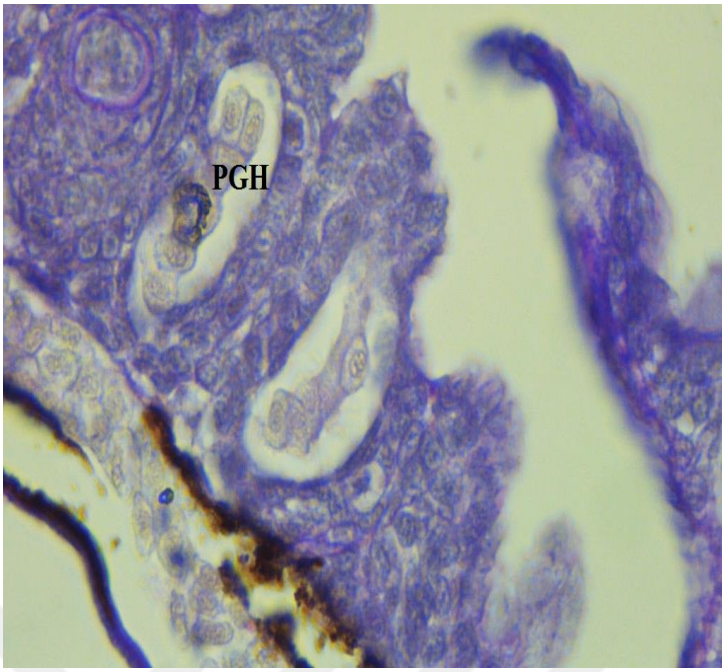


Şekil 4.15. Kontrol grubu, 2. günde görülen primordiyal germ hücresi. vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, vk vitellüs kesesi. Alkalin Fosfataz boyama, x100



Şekil 4.16. Kontrol grubu, 2. günde somitler ile vitellüs kesesi arasında bulunan primordiyal germ hücreleri. vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, s:somit. Alkalin Fosfataz boyama, x100

3. gün itibari ile kalpte, solungaçta (Şekil 4.17.) ve somitlerin ventralinde (Şekil 4.18.) iğ şeklinde, göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. PAS boyasının, primordiyal germ hücrelerindeki glikojen tanelerini spesifik bir şekilde boyadığı görüldü.



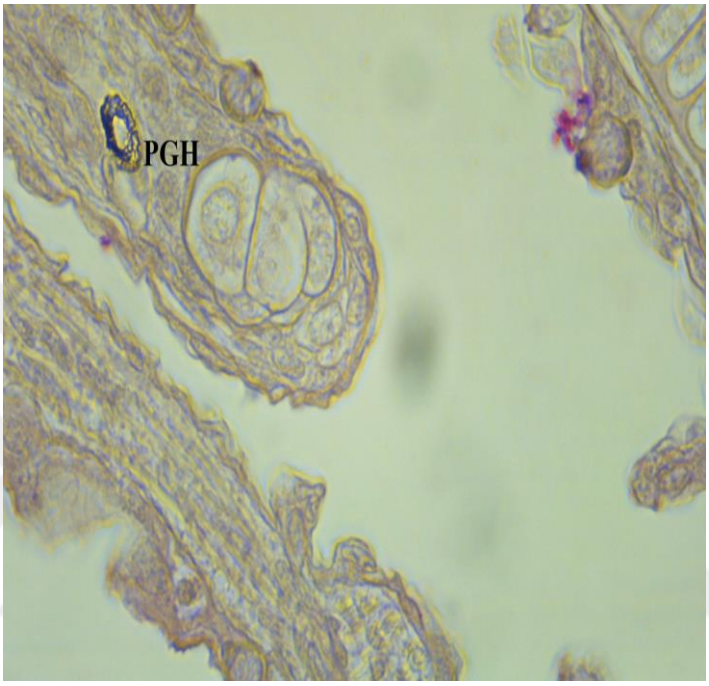
Şekil 4.17. Kontrol grubu, 3. günde solungaç lamellerinde bulunan primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, x100



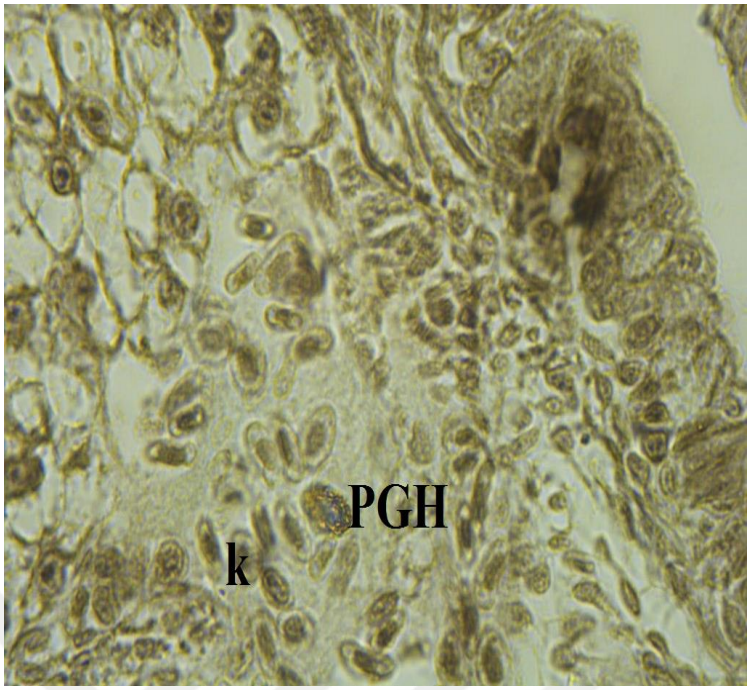
Şekil 4.18. Kontrol grubu, 3. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s:somit. PAS boyama, x100

Gelişimin 5. gününde, Best Carmin, Alkalin Fosfataz ve Toluidin mavisi boyaları ile olumlu yönde reaksiyon veren primordiyal germ hücreleri, solungaçta (Şekil 4.19.)

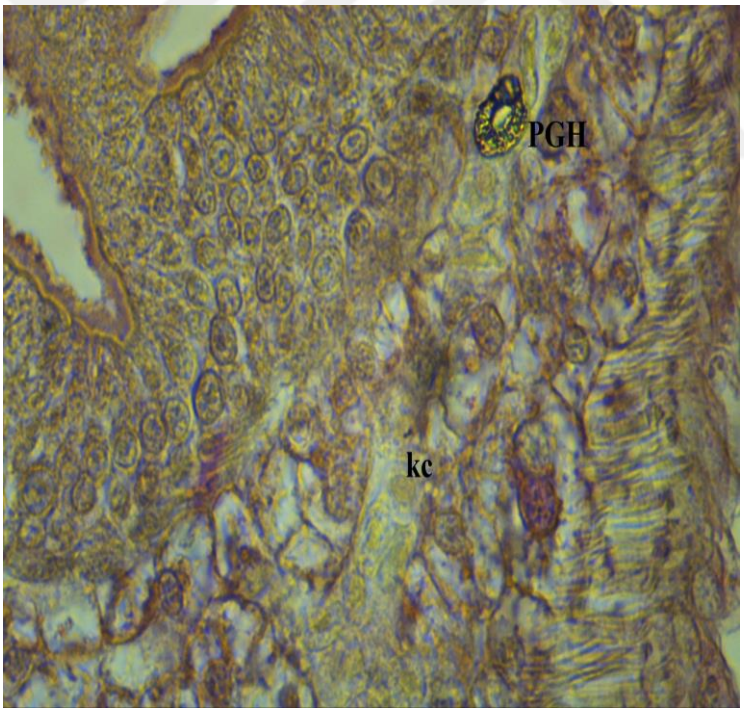
kalpte (Şekil 4.20.), karaciğerde (Şekil 4.21.), somitlerde ve ince barsakta (Şekil 4.22.) tespit edildi. Bu bölgelerde bulunan primordiyal germ hücreleri iğ şekilliydi. Best Carmin ve Toluidin mavisi boyamaları sonucunda primordiyal germ hücreleri içerisinde bulunan glikojen taneleri ve nuage materyali ışık mikroskobu altında net bir şekilde görüntülendi.



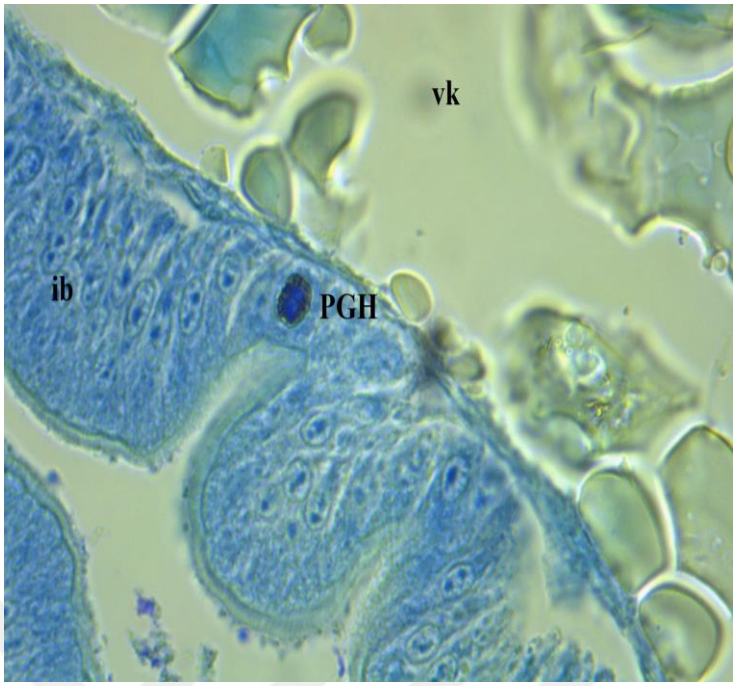
Şekil 4.19. Kontrol grubu, 5. günde solungaç lamellerinde bulunan primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi,:Best Carmine boyama, x100.



Şekil 4.20. Kontrol grubu, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

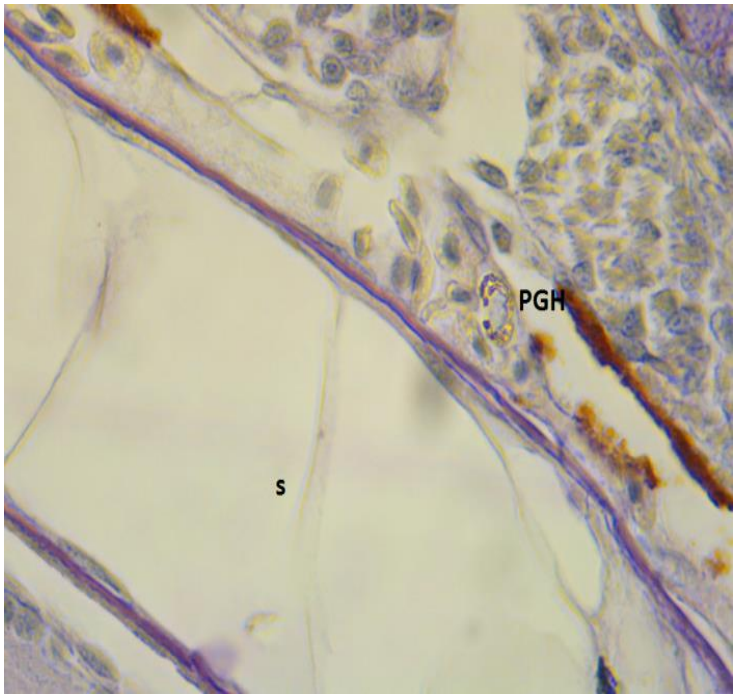


Şekil 4.21. Kontrol grubu, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: karaciğer, Best Carmin boyama, x100.



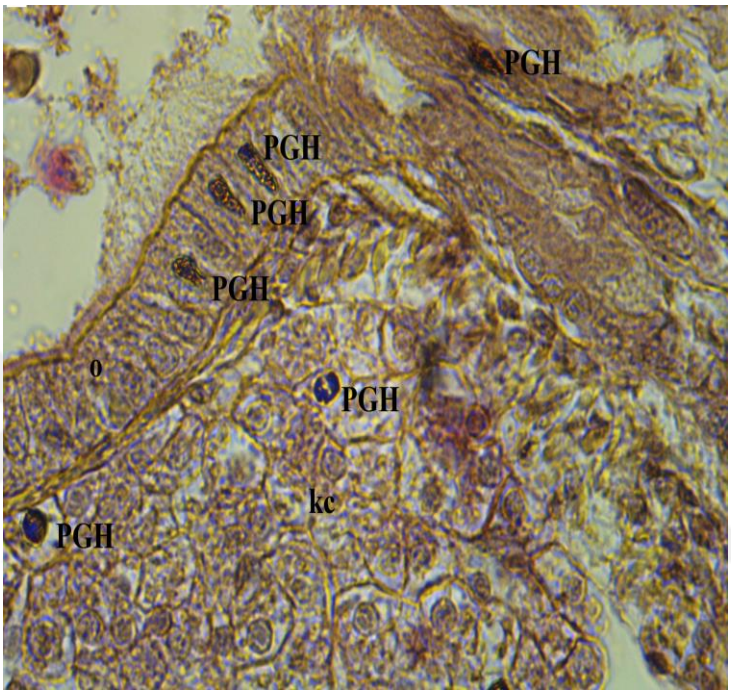
Şekil 4.22. Kontrol grubu, 5. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, vk: vitellüs kesesi. Toluidin mavisi boyama, x100.

Gelişimin 7. gününde primordiyal germ hücreleri, büyük nükleusları ve granüllü sitoplazmaları sayesinde diğer hücrelerden kolaylıkla ayırt edildi. Primordiyal germ hücreleri, kalpte, ince barsakta ve somitlerin dorsalinde (Şekil 4.23.) görüntülendi.



Şekil 4.23. Kontrol grubu, 7. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücresi. s: somit, PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, x100

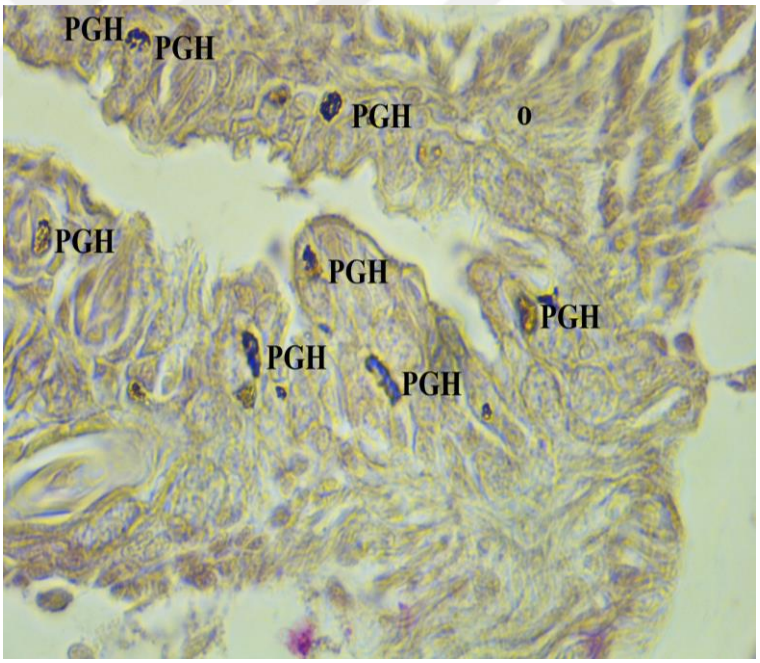
Gelişimin 10. (Şekil 4.24. ve Şekil 4.25.) ve 12. gününde (Şekil 4.26. ve Şekil 4.27.) gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerinin özofagusta, karaciğerde, ince barsakta ve somitlerin dorsalinde ve ventralinde yer aldığı tespit edildi. Karaciğerde bulunan primordiyal germ hücreleri, sabit ve yuvarlak şekilli iken, diğer bölgelerde bulunan ve gonad taslaklarına göç eden primordiyal germ hücreleri amorf idi.



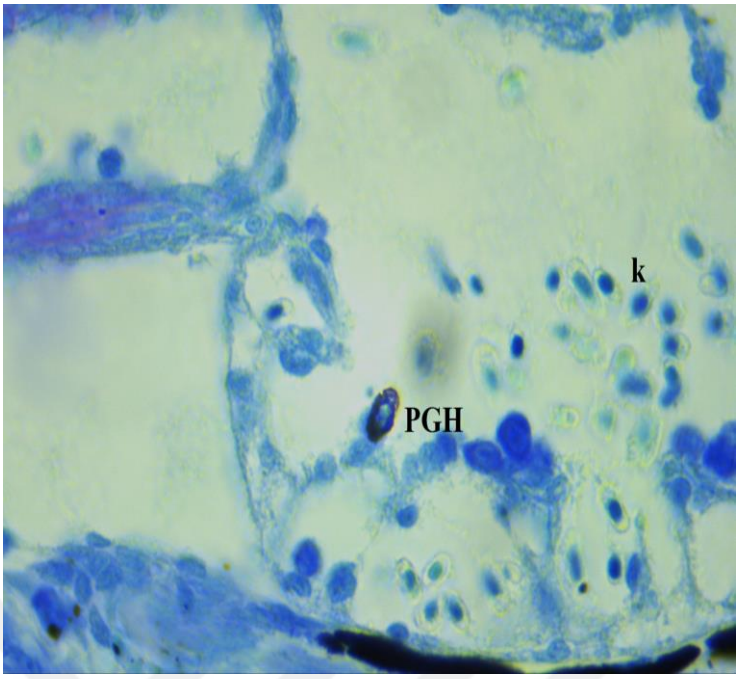
Şekil 4.24. Kontrol grubu, 10. günde karaciğer ve özofagusta bulunan primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, kc: karaciğer, Best Carmine boyama, x100



Şekil 4.25. Kontrol grubu, 10. günde somitlerin kenarında bulunan primordiyal germ hücresi, s: somit, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100

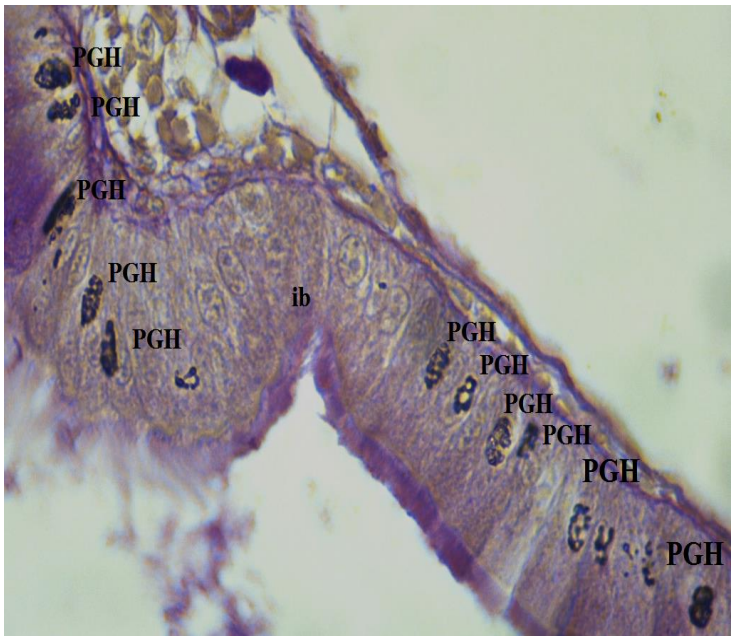


Şekil 4.26. Kontrol grubu, 12. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, Best Carmine boyama, x100



Şekil 4.27. Kontrol grubu, 12. günde kalpte görülen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100

Gelişimin 13. gününde özofagus, karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.28.) amorf primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Histolojik kesitlerde gonadal bölgede primordiyal germ hücrelerinin goniyal hücrelere farklılaşarak oluşturduğu ilkel bir gonad yapısı tespit edildi (Şekil 4.29.).

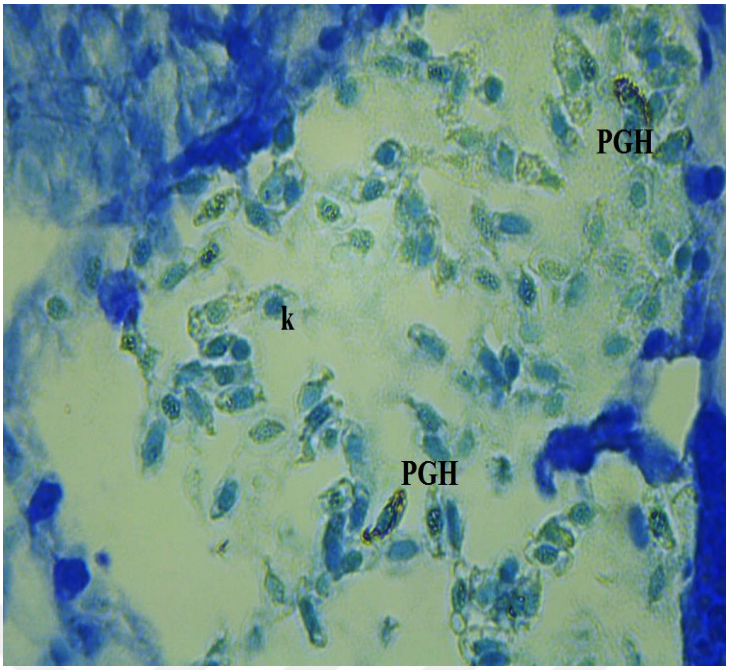


Şekil 4.28. Kontrol grubu, 13. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100

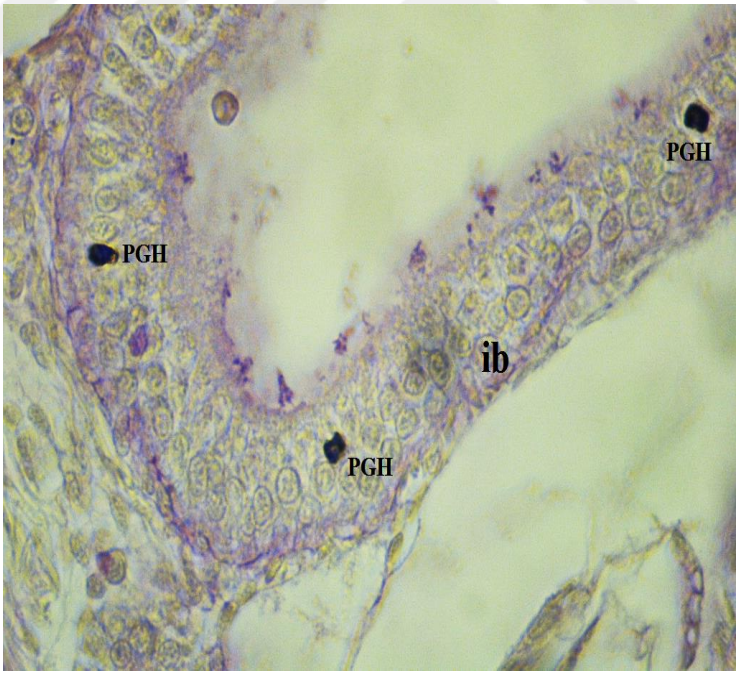


Şekil 4.29. Kontrol grubu, 13. günde gonadal bölge, ib: ince barsak, gd: gonad. PAS ve Toluidin mavisi boyama, x100, x4.

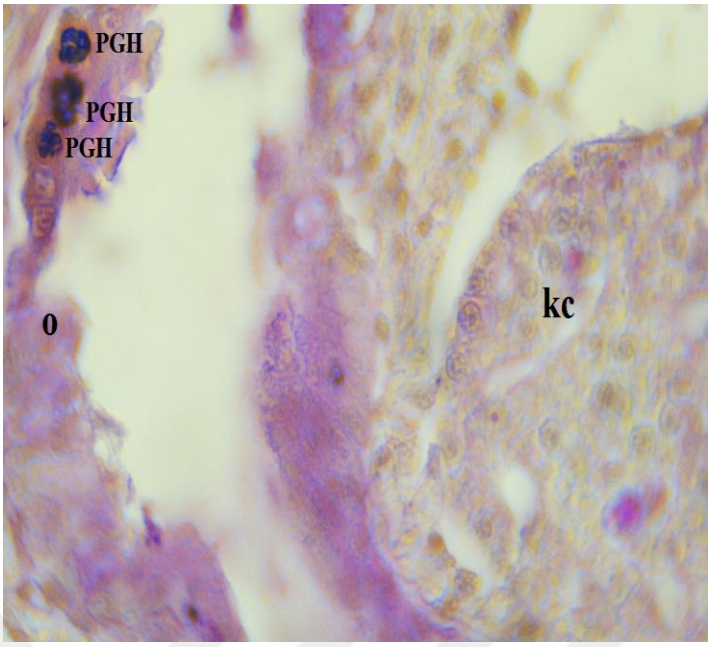
16. (Şekil 4.30. ve Şekil 4.31.) ve 17. (Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.) günlerde alınan kesitlerde primordiyal germ hücrelerinin özofagusta, karaciğerde, kalpte ve ince barsakta yer aldığı görüldü. Kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri iğ şeklinde, özofagus ve ince barsaktaki hücreler ise daha yuvarlak şekildeydi. Gelişimin bu safhasında germ hücreleri, koyu boyanmış çekirdekleri ile net bir şekilde diğer hücrelerden ayırt edildi. Gonad yapısı incelendiğinde, primordiyal germ hücrelerinin goniyal hücrelere farklılaştığı görüldü. Bu bölgede pek çok goniyal hücrenin bir araya gelmesiyle oluşan ilkel bir gonad yapısı tespit edildi.



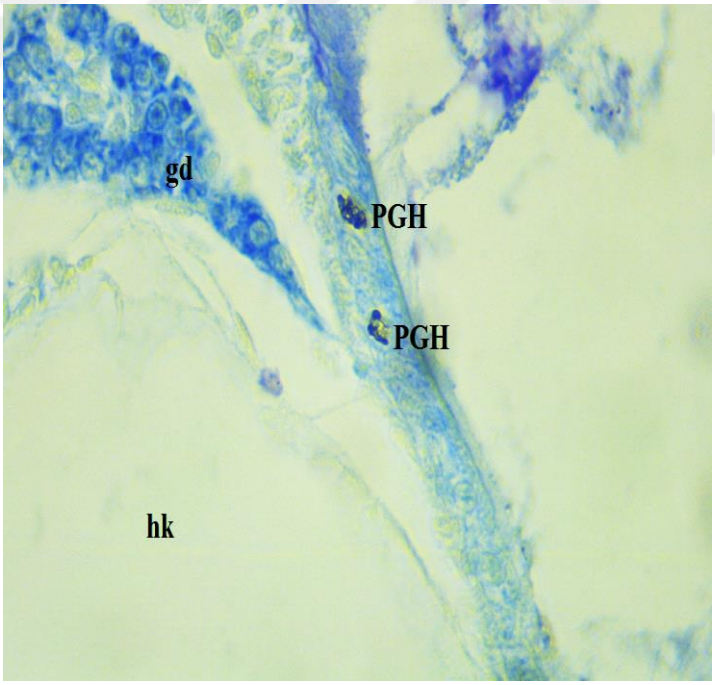
Şekil 4.30. Kontrol grubu, 16. günde kalpte görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.31. Kontrol grubu, 16. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100.



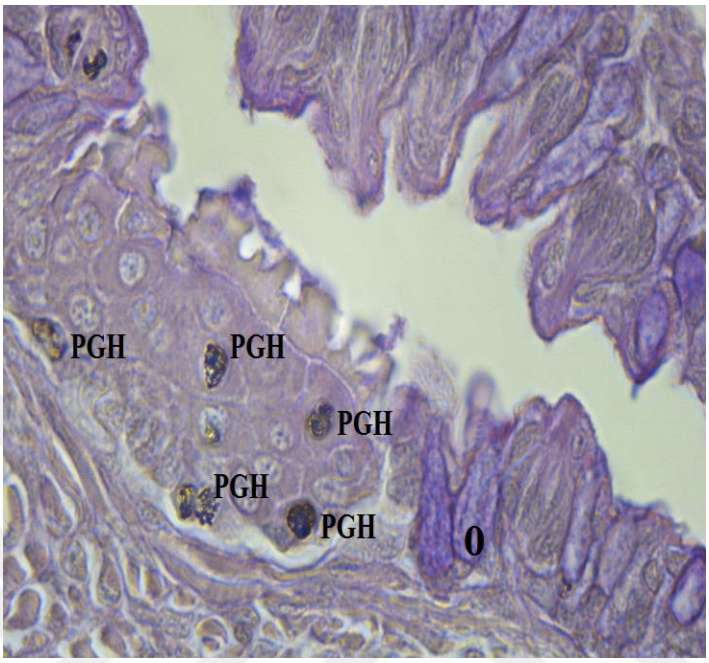
Şekil 4.32. Kontrol grubu, 17. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, kc: karaciğer, PAS boyama, x100.



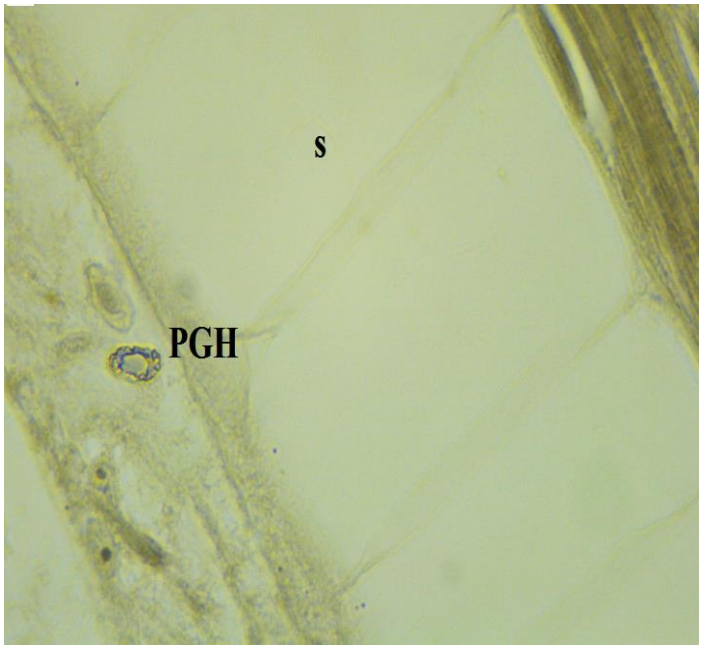
Şekil 4.33. Kontrol grubu, 17. günde gonadal bölgeye göç eden primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, , gd: gonad, hk: hava kesesi, Toluidin mavisi boyama, x40

Gelişimin 19. gününde özofagusta (Şekil 4.34.), ince barsakta ve somitlerde (Şekil 4.35.), göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Önceki günlere nazaran daha gelişmiş bir gonad yapısı izlendi. Alınan kesitlerde bazofilik

sitoplazmaya sahip germ hücrelerinin farklılaşmaya başladığı tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde, kist benzeri goniyal hücrelerde mitotik aktiviteler görülmeye başlandı (Şekil 4.36.).



Şekil 4.34. Kontrol grubu, 19. günde özofagusta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama, x100.

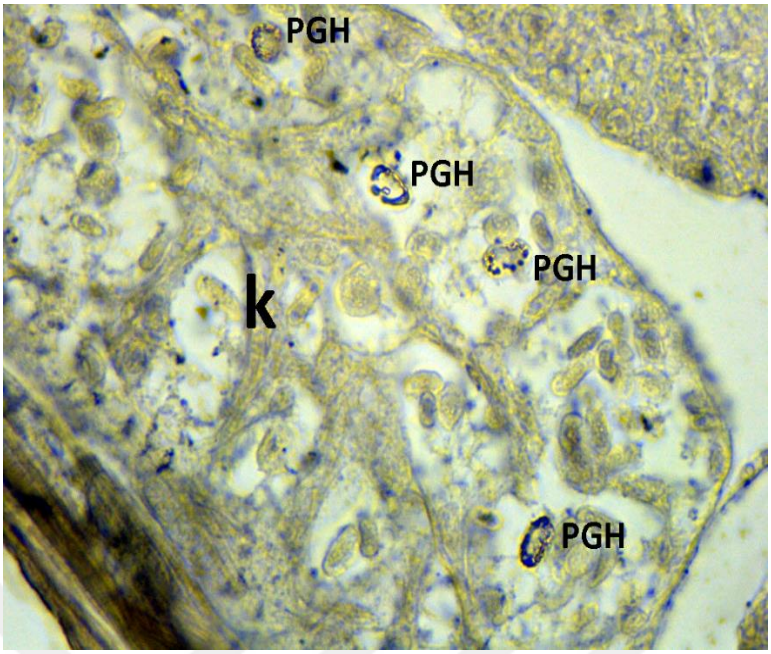


Şekil 4.35. Kontrol grubu, 19. günde somitlerde görülen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: somit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

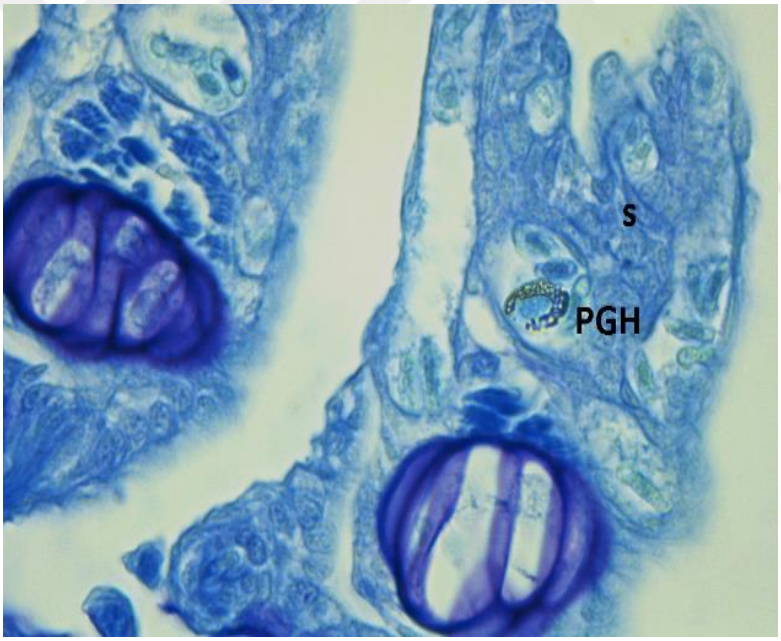


Şekil 4.36. Kontrol grubu, 19. gün, gonad yapısı, ok: hücrelerde mitotik aktivite, gd:gonad, Alkalin Fosfataz boyama, x100

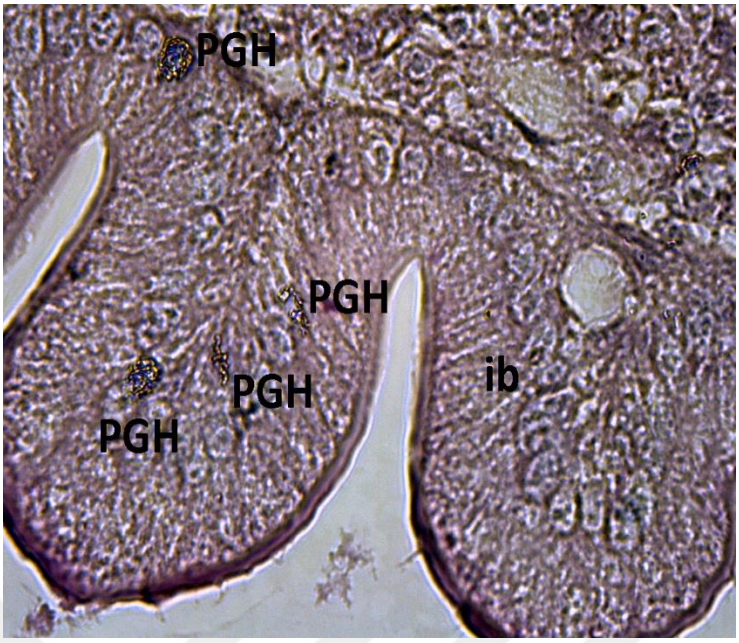
25. gün itibari ile göç etmekte olan iğ şekilli primordiyal germ hücrelerine kalpte (Şekil 4.37.), solungaçta (Şekil 4.38.), karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.39.) rastlandı. Bu hücreler granüllü sitoplazmaları sayesinde kolayca teşhis edildi. Sitoplazmalarında, alkalin fosfataz aktivitelerinin yoğun olduğu görüldü. İçerdikleri nuage materyali sayesinde oval şekilli bu hücrelerin Toluidin mavisi boyası ile farklı bir şekilde boyandığı görüldü. Gonad yapısında cinsiyet farklılaşmasının başladığı, primordiyal germ hücrelerinin morfolojik olarak goniyal hücreler olan oogonyum ya da spermatogonyumlara farklılaştığı gözlendi. Buna karşın net bir cinsiyet tespiti yapılamadı. Goniyal hücrelerin, tip 1 ve tip 2 germ hücrelerini oluşturmaya başladıkları tespit edildi. Tip 1 germ hücresinin bazofilik sitoplazmalı, büyük çekirdek ve birkaç çekirdekçiğe sahip olduğu görüldü. Tip 2 germ hücresi ise, tip1 germ hücresine göre daha büyük boyutlu, karyoplazmasında kromatin iplikler içeren hücreler olduğu tespit edildi. Daha sonra bu hücrelerin perinükleolar oositlere farklılaştığı görüldü. (Şekil 4.40.)



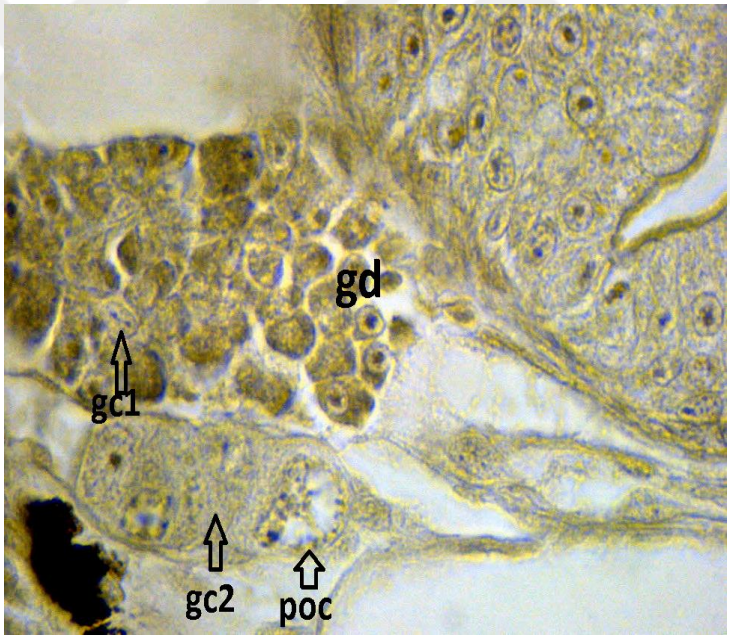
Şekil 4.37. Kontrol grubu, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100



Şekil 4.38. Kontrol grubu, 25. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100

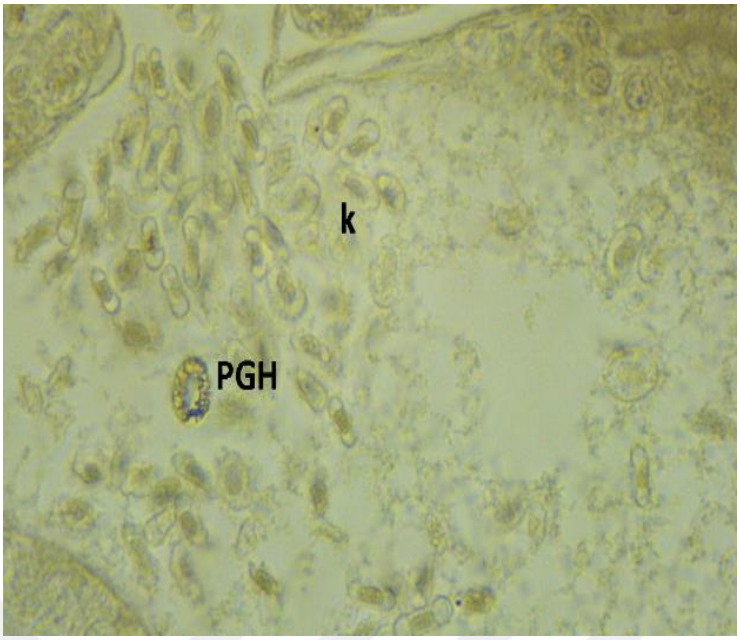


Şekil 4.39. Kontrol grubu, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best carmin boyama, x100

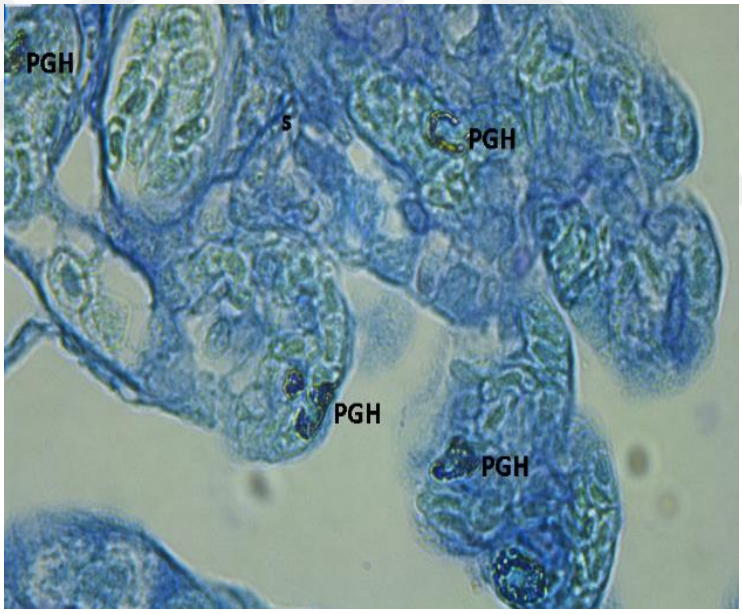


Şekil 4.40. Kontrol grubu, 25. gün, gonad yapısı, gd: gonad, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, poc: perinükleolar oosit, Alkalin Fosfataz boyama, x100

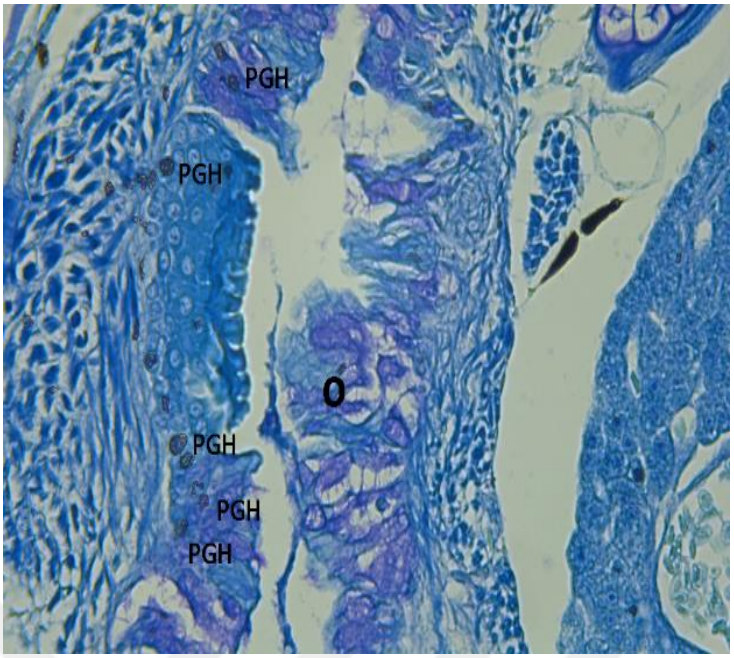
Gelişimin 29. gününde, iri nükleuslu ve bol granüllü sitoplazmaya sahip göç durumundaki primordiyal germ hücreleri, kalpte (Şekil 4.41.), solungaç lamellerinde (Şekil 4.42.), özofagusta (Şekil 4.43.) ve ince barsakta (Şekil 4.44.) görüldü.



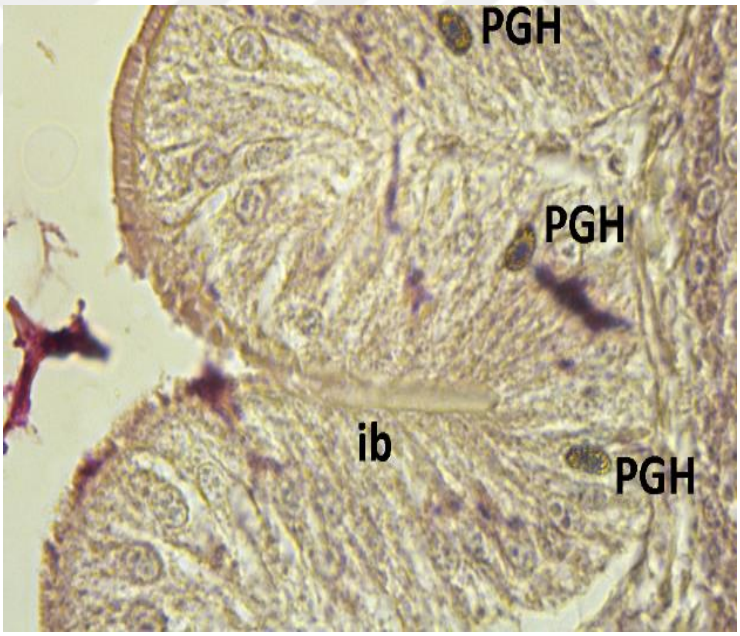
Şekil 4.41. Kontrol grubu, 29. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi,, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.42. Kontrol grubu, 29. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi,, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



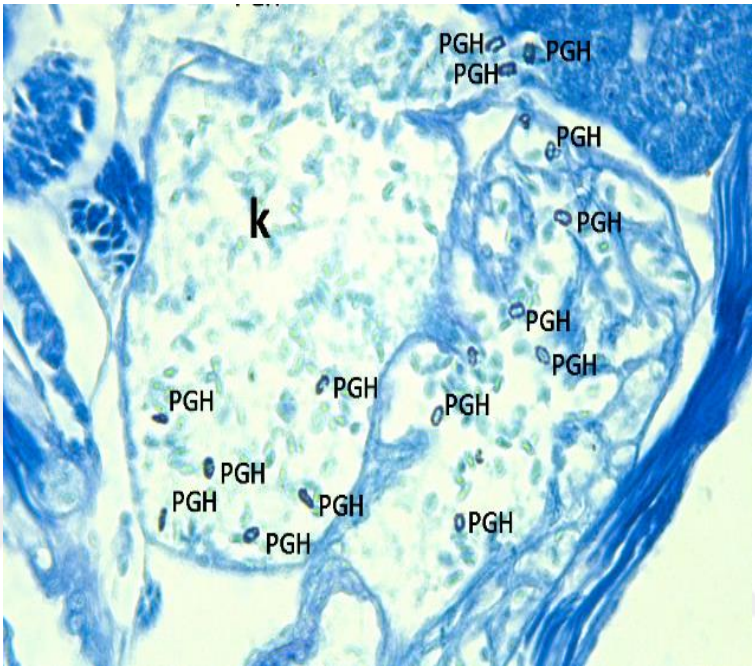
Şekil 4.43. Kontrol grubu, 29. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi,, o: özofagus, Toluidin mavisi boyama, x40.



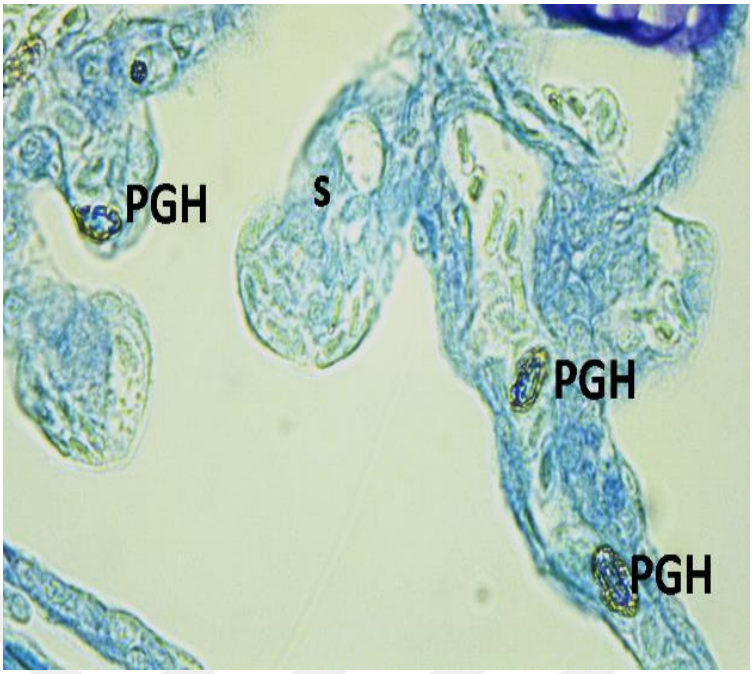
Şekil 4.44. Kontrol grubu, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi,, ib: ince barsak, Best carmin boyama, x100.

Gelişimin 33. gününde, kalpte (Şekil 4.45.), solungaçta (Şekil 4.46.), karaciğerde (Şekil 4.47.) ve ince barsakta (Şekil 4.48.) ameboid hareketlerle göç etmekte olan primordiyal germ hücre gruplarına rastlandı. Bu hücrelerdeki alkalin fosfataz aktivitesinin yoğun olduğu görüldü. Katyonik yapıya sahip olan Toluidin mavisi

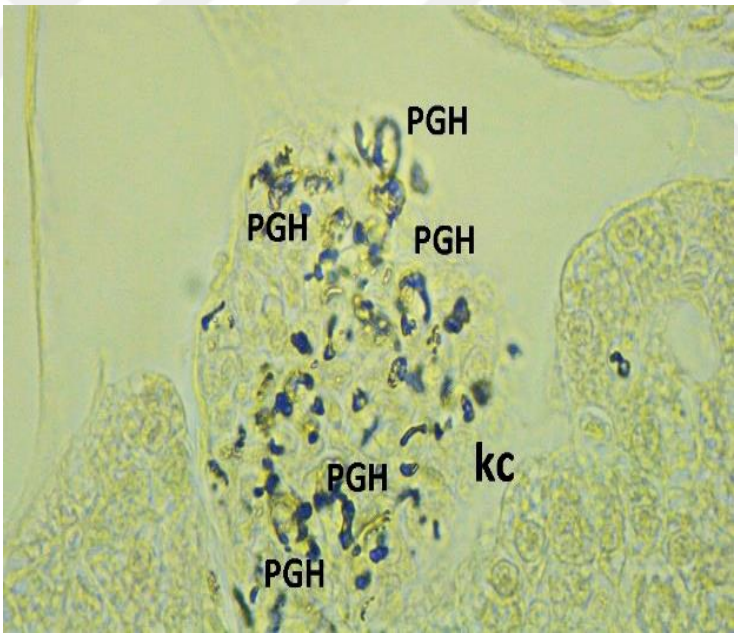
boyasının primordiyal germ hücrelerinde bulunan elektronca yoğun materyalleri (nuage materyali) somatik hücrelerden farklı bir biçimde boyadığı tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde, goniyal hücrelerin varlığı görüldü. Bu hücrelerin tip 1 ve tip 2 germ hücrelerine farklılaştığı tespit edildi (Şekil 4.49.). Goniyal hücrelerin kist benzeri yapılar içerisinde organize olduğu görüldü (Şekil 4.50.).



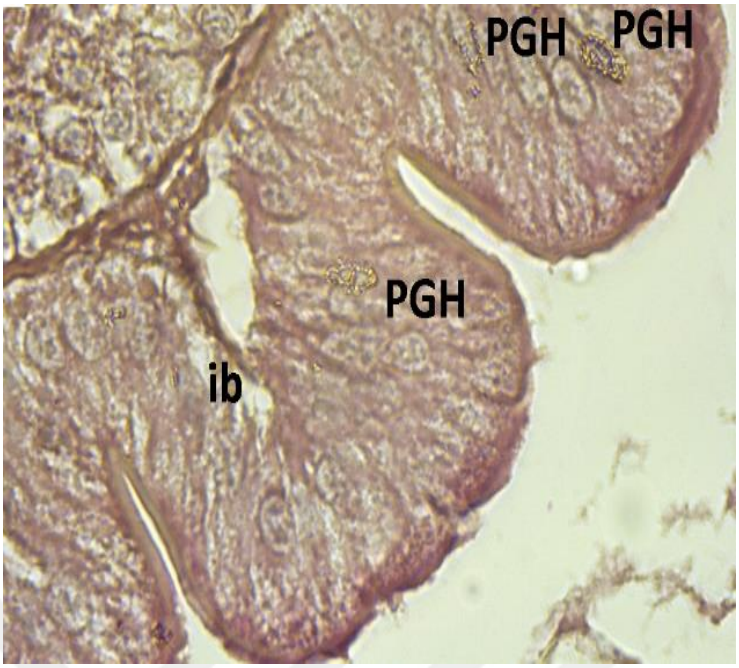
Şekil 4.45. Kontrol grubu, 33. gün, kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x40.



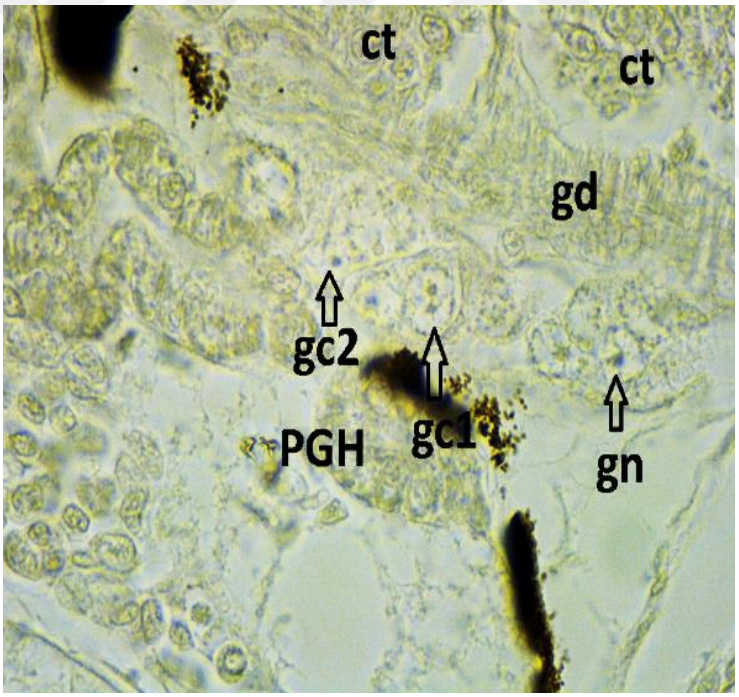
Şekil 4.46. Kontrol grubu, 33. gün, solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



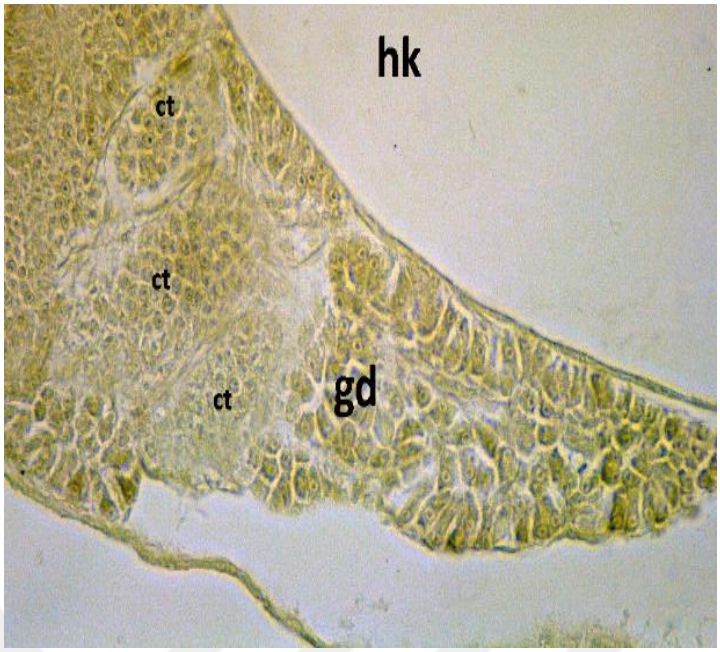
Şekil 4.47. Kontrol grubu, 33. gün, karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.48. Kontrol grubu, 33. gün, ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.

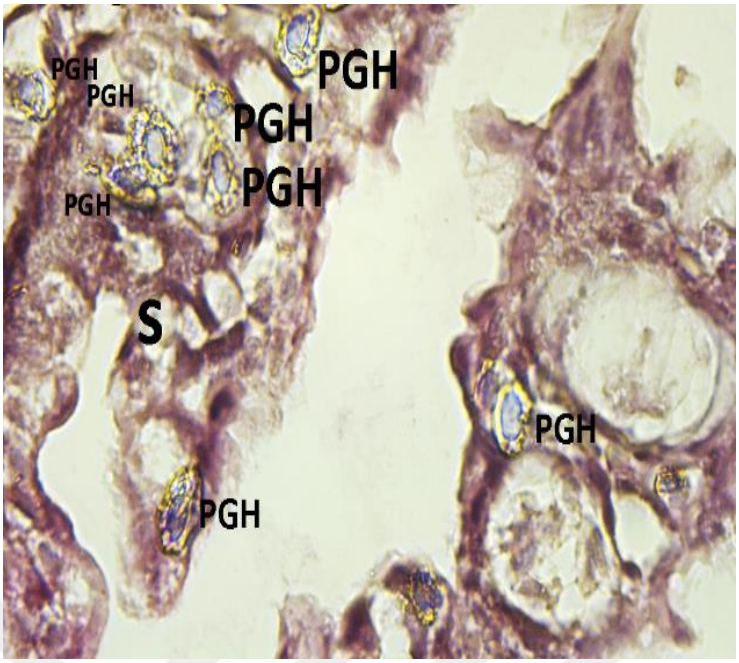


Şekil 4.49. Kontrol grubu, 33. gün, gonad yapısı, PGH: primordiyal germ hücresi, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, ct: kist benzeri yapılar, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

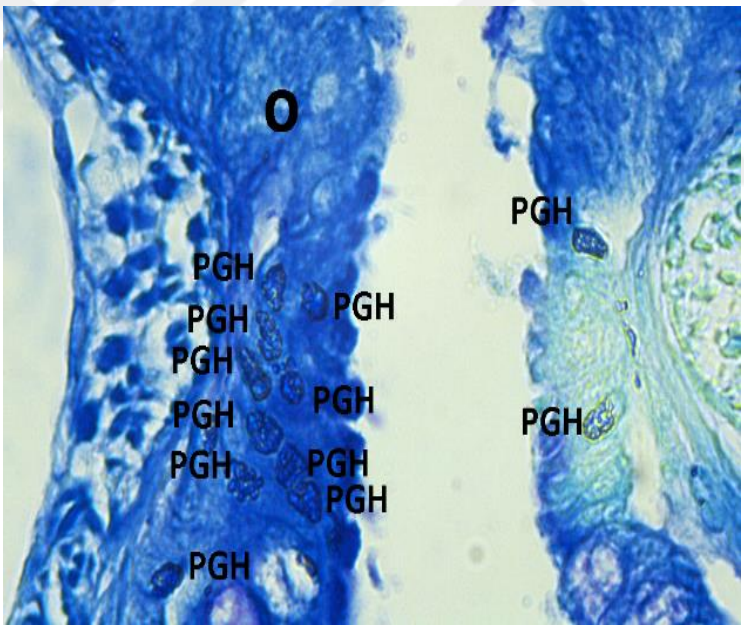


Şekil 4.50. Kontrol grubu, 33. gün, gonad yapısı, gd: gonad, ct: kist benzeri yapılar, hk: hava kesesi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

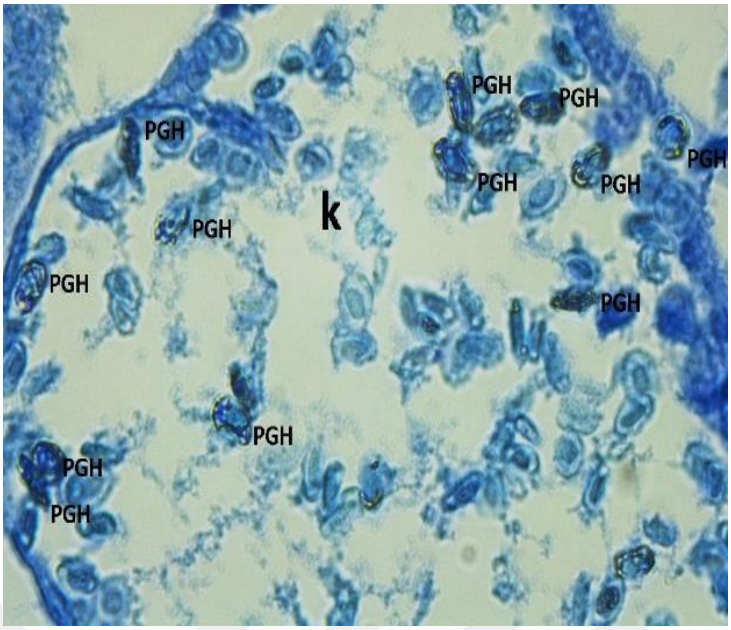
37. günde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.51.), özofagusta (Şekil 4.52.), kalpte (Şekil 4.53.), karaciğerde, ince barsakta (Şekil 4.54.) gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. İğ şeklinde olan ve sitoplazmasında bol miktarda glikojen granülleri içeren bu hücrelerin PAS ve Best Carmin boyaları ile, içerdikleri bulutsu (nuage) materyaller sayesinde ise toluidin mavisi boyaları ile farklı bir şekilde boyandıkları görüldü. Gonad yapısında ise goniyal hücrelerin tip 1 ve tip 2 hücrelerine farklılaştığı görüldü. (Şekil 4.55. ve Şekil 4.56.).



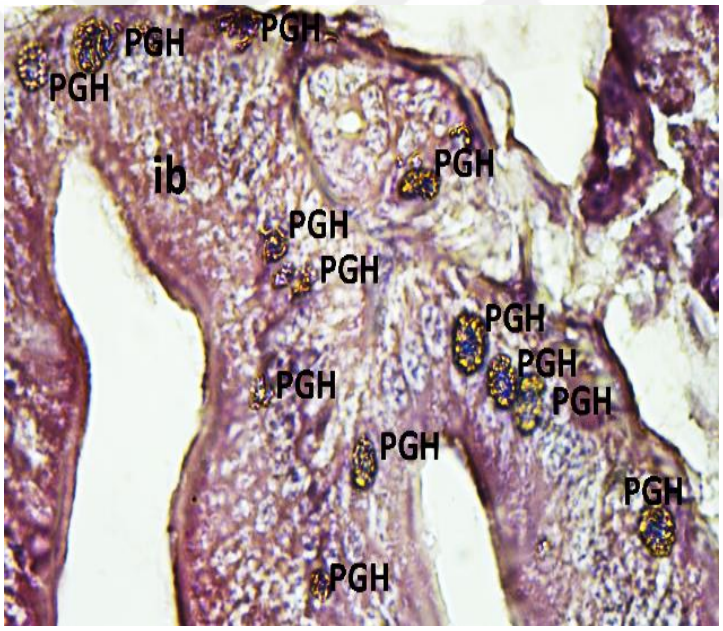
Şekil 4.51. Kontrol grubu, 37. gün, solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi,, s: solungaç, Best carmine boyama, x100.



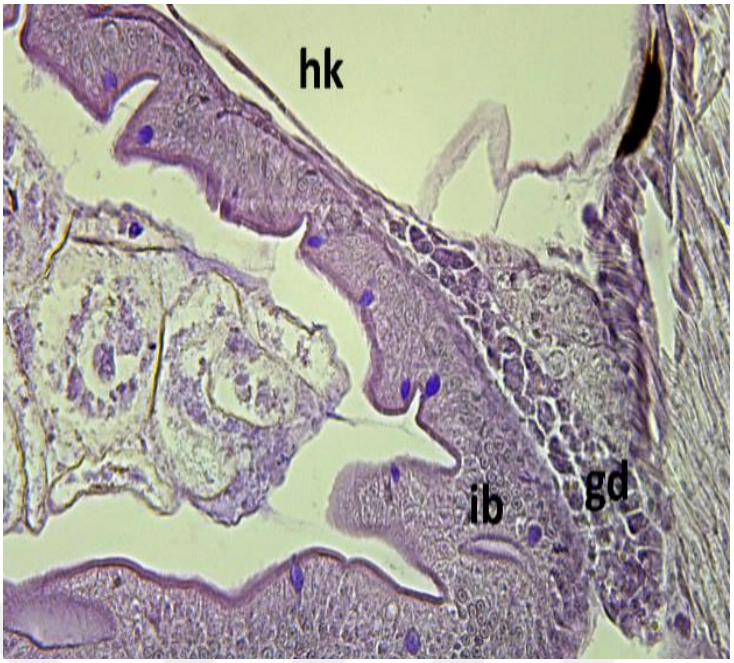
Şekil 4.52. Kontrol grubu, 37. gün, özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, Toluidin mavisi boyama, x40.



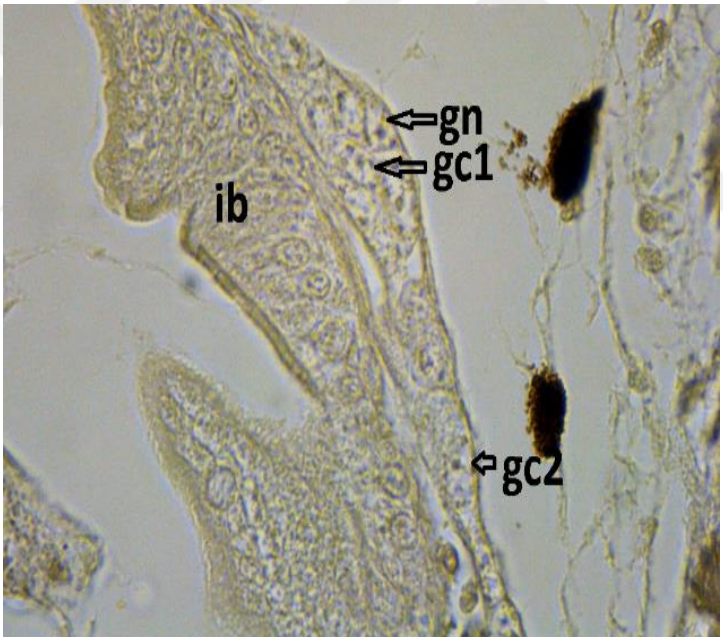
Şekil 4.53. Kontrol grubu, 37. gün, kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.54. Kontrol grubu, 37. gün, ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.



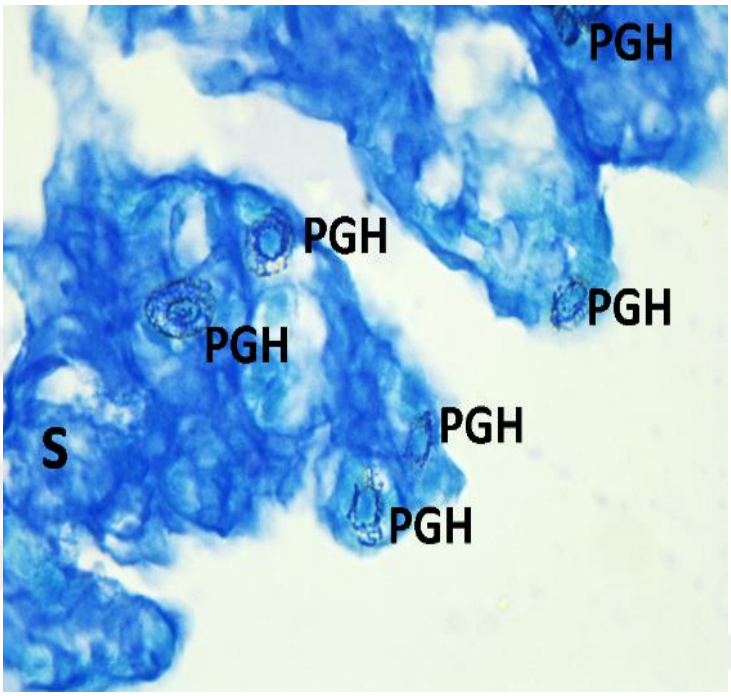
Şekil 4.55. Kontrol grubu, 37. gün, gonad yapısı, ib: ince barsak, gd: gonad. PAS boyama, x100.



Şekil 4.56. Kontrol grubu, 37. gün. gonad yapısı, ib: ince barsak, gd: gonad, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

Gelişimin 42. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.57.), özofagusta, kalpte, karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.58.) gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Önceki günlere kıyasla daha gelişmiş bir gonad yapısı izlendi. Burada çok sayıda perinükleolar oosit net bir şekilde görüntülendi (Şekil 4.59.). Mitoz ve mayoz bölünme geçiren pek çok hücre tespit

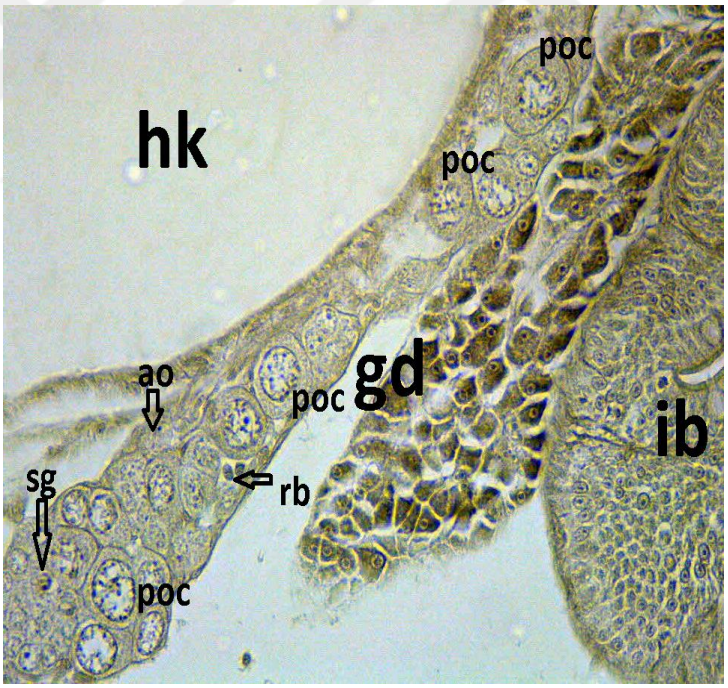
edildi. Bu hücrelerin genellikle 4-8 hücreli kist benzeri yapılar içerisinde yer aldığı görüldü. Kist benzeri oluşumların orta kısmında lümen olduğu tespit edildi. Bunun yanı sıra dejenere oositler ve rezidual cisimcikler görüntülendi. Gonadın testis dokusunu oluşturmak üzere farklılaşmaya başladığı tespit edildi (Şekil 4.60.).



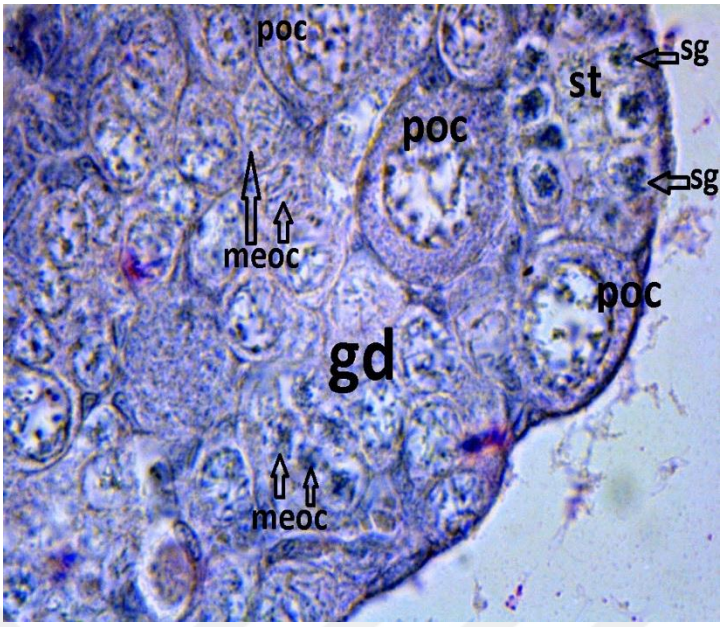
Şekil 4.57. Kontrol grubu, 42. gün, solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi,, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.58. Kontrol grubu, 42. gün, ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, PAS boyama, x100.

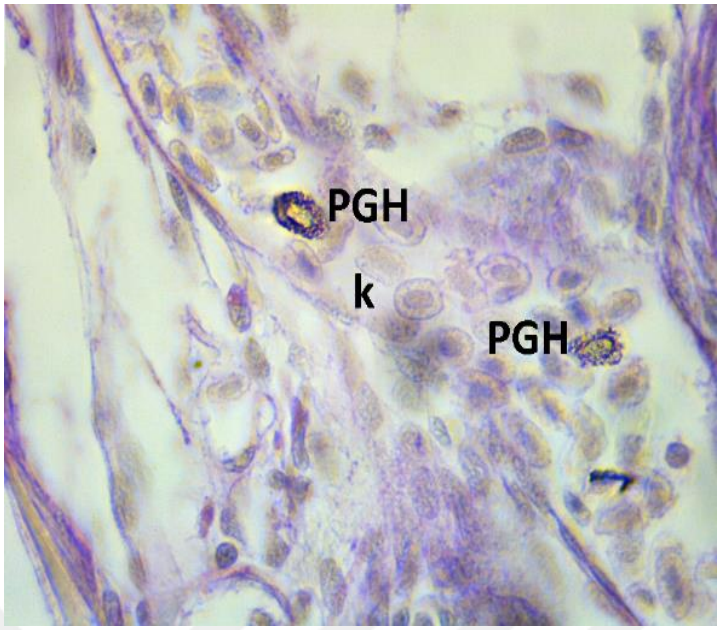


Şekil 4.59. Kontrol grubu, 42. günde gonad yapısı, ib: ince barsak, gd: gonad, hk: hava kesesi, poc: perinükleolar oosit, rb: rezidual cisimcikler, ao: Atretic oosit, sg: spermatogonyum. Alkalin Fosfataz boyama, x100.

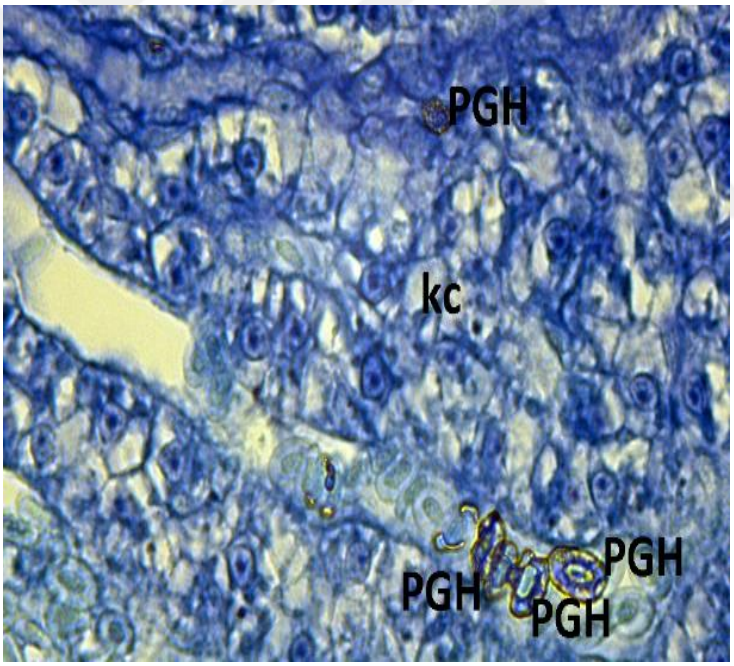


Şekil 4.60. Kontrol grubu, 42. günde gonad yapısı, gd: gonad oluşumu, meoc: mayoz bölünme geçiren hücreler, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum. PAS boyama, x100.

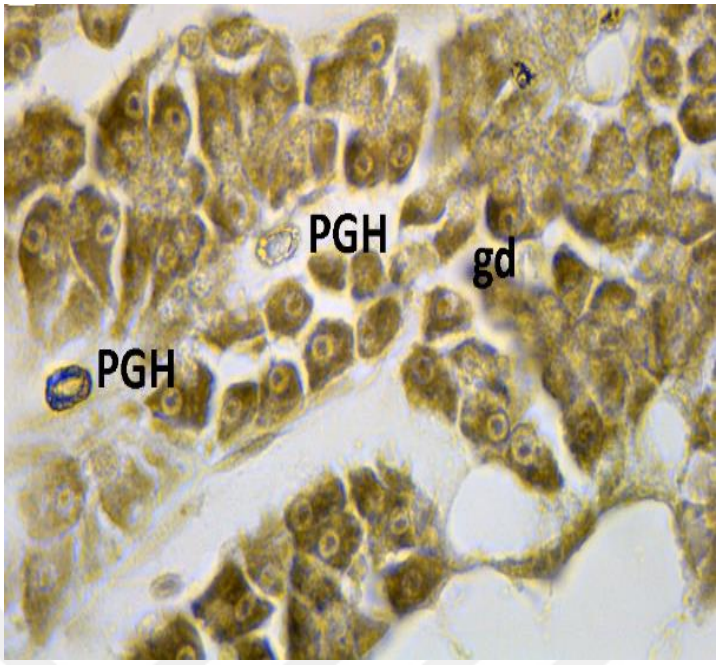
Gelişimin 47. gününde solungaç, kalp (Şekil 4.61.), karaciğer (Şekil 4.62.), ince barsak, gonadal bölgede (Şekil 4.63.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısında farklılaşan bölgede perinükleolar oositler, tip 1 ve tip 2 germ hücreleri görüldü. Çok sayıda goniyal hücrenin kist benzeri yapılar içerisinde yer aldığı izlendi. Kist benzeri yapıların orta kısmında lümen görüntülenemedi. Gonad yapısının testis yönünde farklılaştığı tespit edildi (Şekil 4.64.).



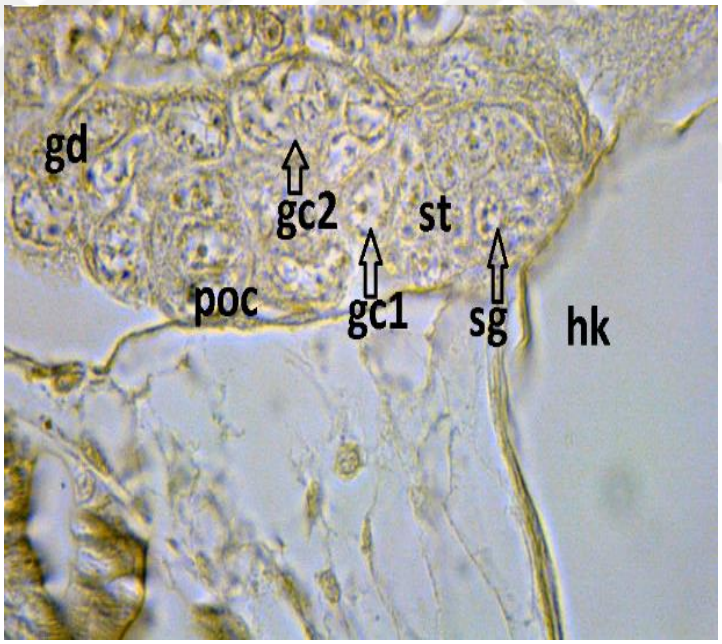
Şekil 4.61. Kontrol grubu, 47. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, PAS boyama, x100.



Şekil 4.62. Kontrol grubu, 47. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Toluidin mavisi boyama, x100.



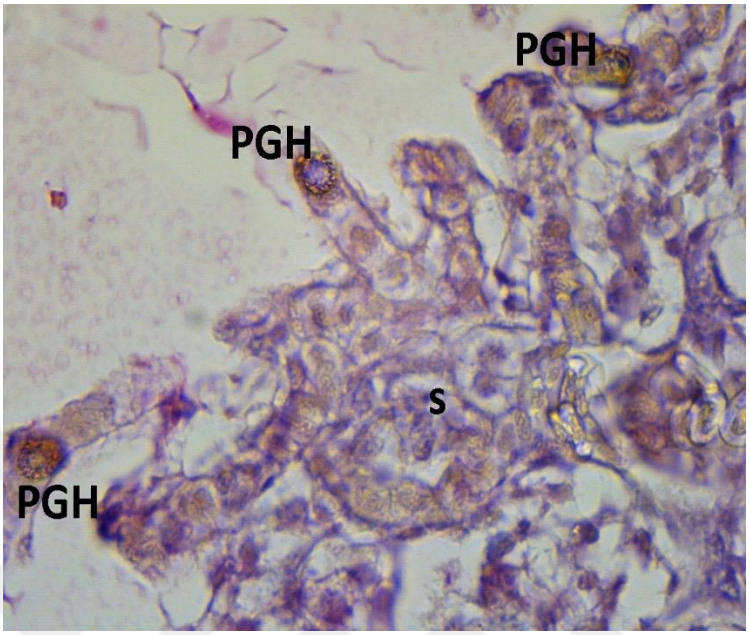
Şekil 4.63. Kontrol grubu, 47. günde gonad bölgesinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



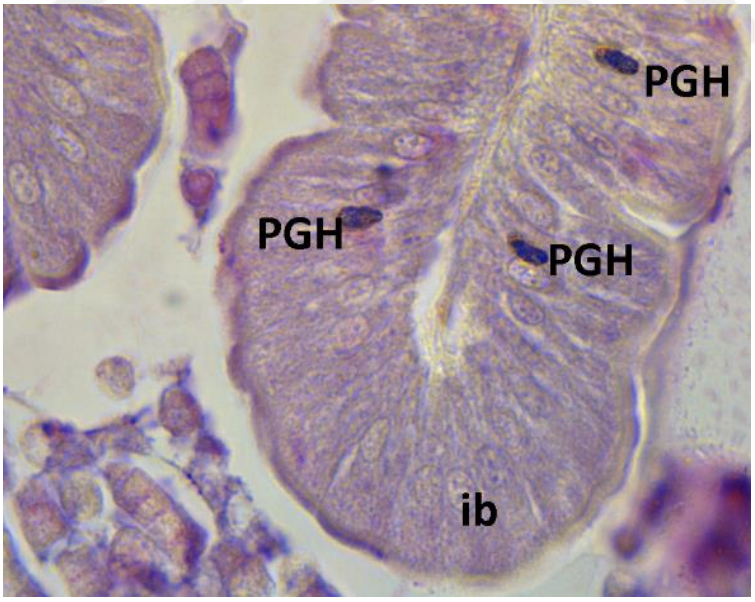
Şekil 4.64. Kontrol grubu, 47. günde gonad yapısı, gd: gonad, hk: hava kesesi, poc: perinükleolar oosit, , gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum. Alkalin Fosfataz boyama, x100.

52. günde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.65.), karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.66.) göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Solungaç lamellerinde yuvarlak şekilli, ince barsaklarda görülen primordiyal germ hücreleri ise oval şekle sahipti. Perinükleolar oositlerin dejenere olmaya başlayıp gonad yapısının testisi

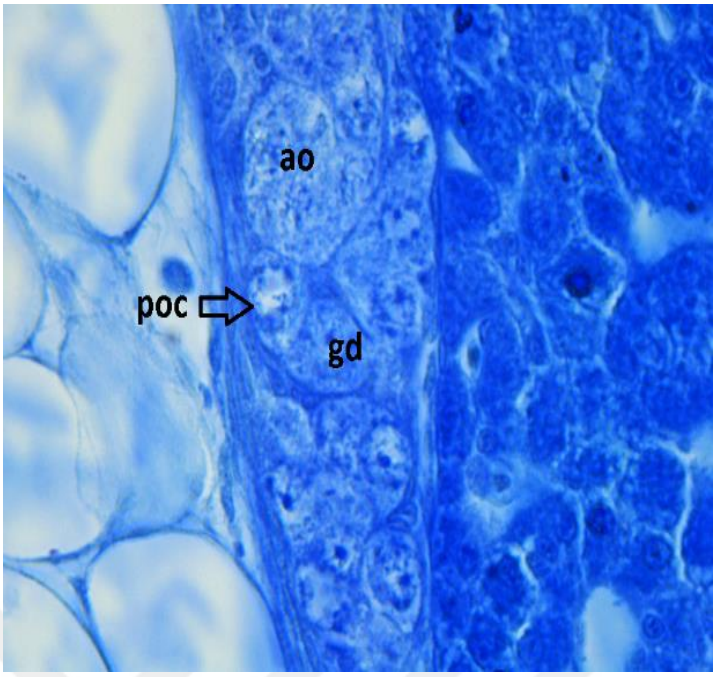
oluşturmak üzere farklılaştığı tespit edildi (Şekil 4.67.). Seminifer tübül yapısını oluşturmak üzere spermatogonyumların biraraya geldikleri görüntülendi (Şekil 4.68.).



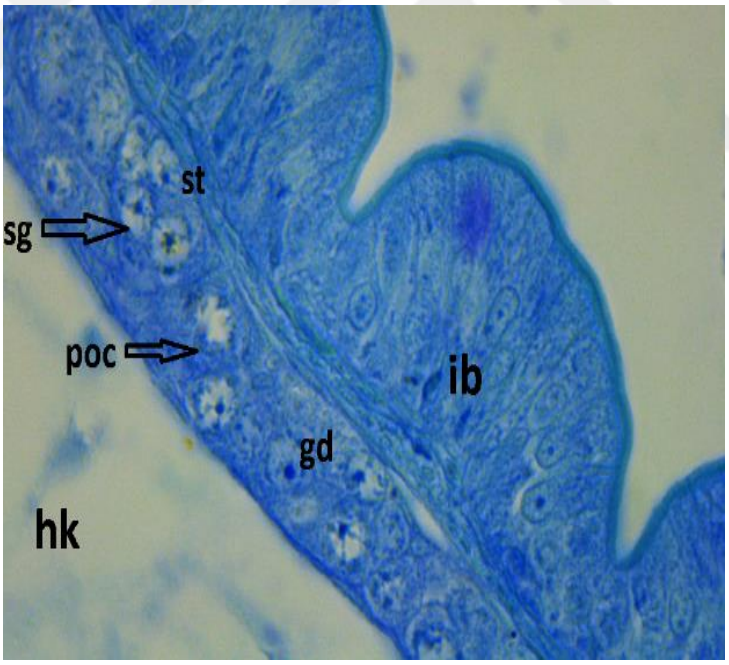
Şekil 4.65. Kontrol grubu, 52. günde solungaçlarda görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, PAS boyama, x100.



Şekil 4.66. Kontrol grubu, 52. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100.



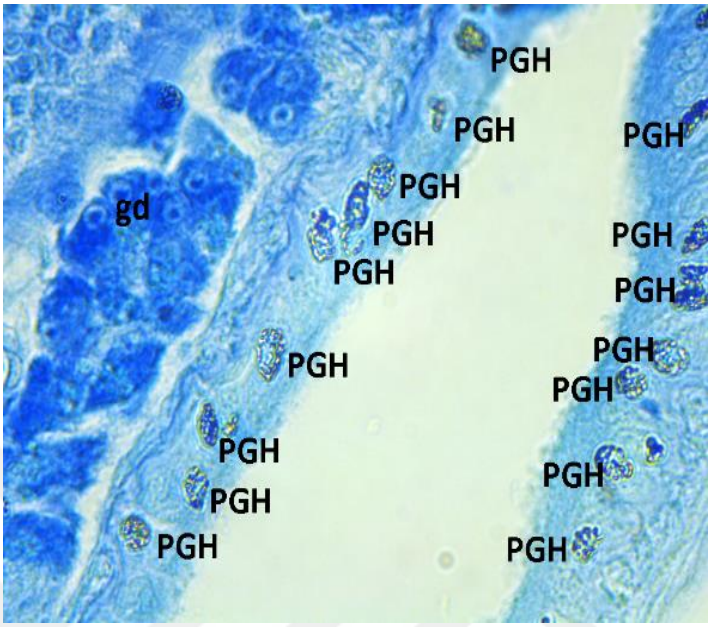
Şekil 4.67. Kontrol grubu, 52. günde gonad yapısı. gd: gonad, ao: atretik oosit, poc: perinükleolar oosit, Toluidin mavisi boyama, x100.



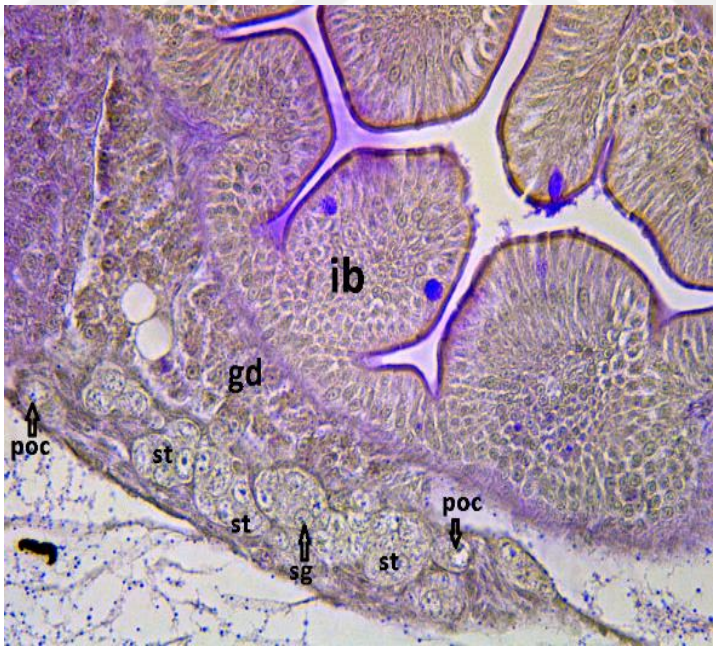
Şekil 4.68. Kontrol grubu, 52. günde gonad yapısı. ib: ince barsak, gd: gonad, hk: hava kesesi, poc: perinükleolar oosit, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum. Toluidin mavisi boyama, x40.

Gelişimin 57. gününde sadece gonadal bölgede ameboid hareketlerle göç etmekte olan primordiyal germ hücre grubuna rastlandı (Şekil 4.69.). Gonad yapısının ve farklılaşmasının 52. gün ile benzer olduğu görüldü. Gonadın testis yönünde

farklılaştığı tespit edildi. Spermatogonyumların seminifer tübüller içerisinde organize oldukları gözlendi (Şekil 4.70.).



Şekil 4.69. Kontrol grubu, 57. günde gonad bölgesinde görülen primordiyal germ hücreleri, gonad yapısı, gd: gonad, PGH: primordiyal germ hücresi. Toluidin mavisi boyama, x40.



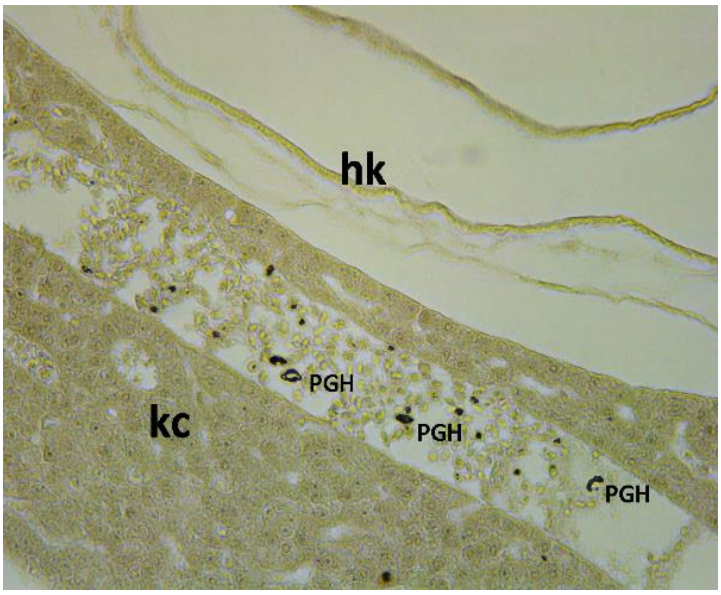
Şekil 4.70. Kontrol grubu, 57. günde gonad yapısı. ib: ince barsak, gd: gonad, poc: perinükleolar oosit, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum. PAS boyama x40.

60. günde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.71.), karaciğer ile hava kesesi arasında (Şekil 4.72.) ve gonadal bölgede primordiyal germ hücrelerine rastlandı. İğ şekilli bu

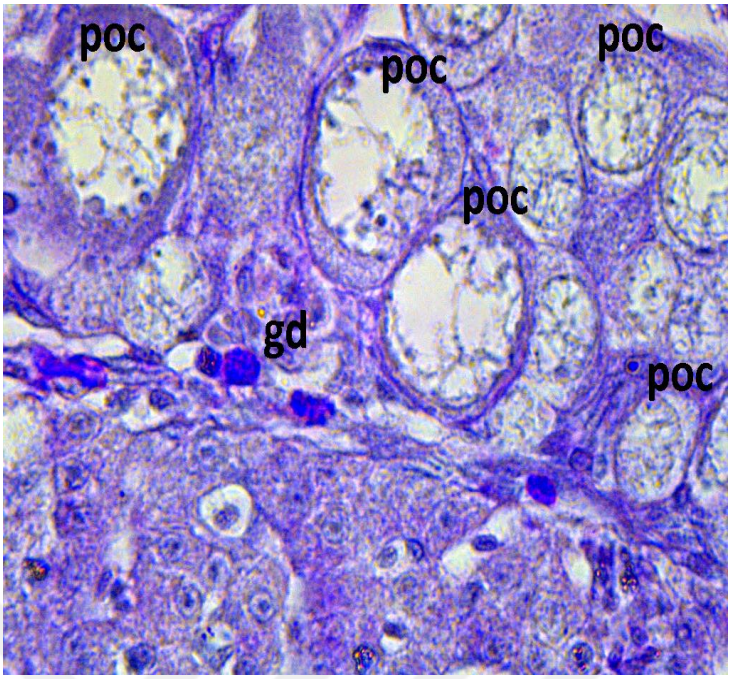
hücrelerin alkalin fosfataz boyamasına pozitif yanıt verdiği görüldü. Gonad yapısının ovaryumu oluşturmak üzere organize olduğu tespit edildi. Çok sayıda perinükleolar oosit ve primer oosit gözlendi (Şekil 4.73. ve Şekil 4.74.).



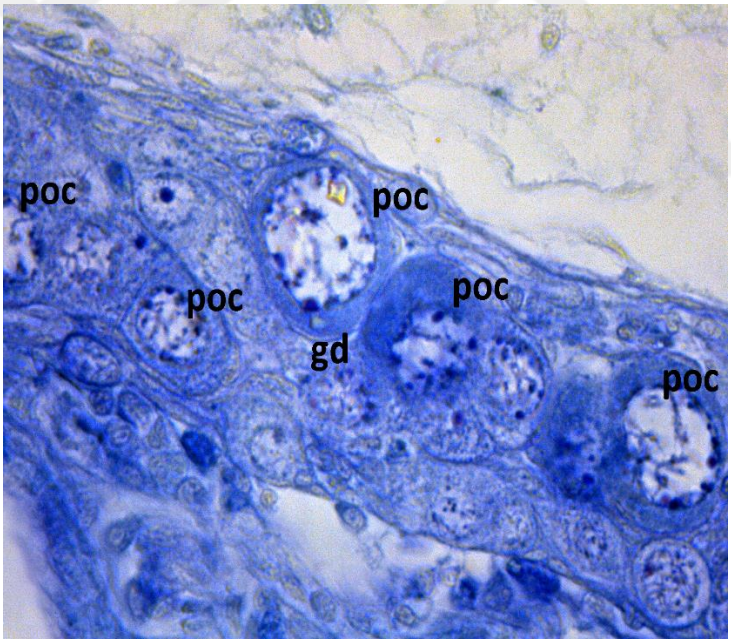
Şekil 4.71. Kontrol grubu, 60. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç. Alkalin Fosfataz boyama x40.



Şekil 4.72. Kontrol grubu, 60. günde karaciğer ile hava kesesi arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, hk: hava kesesi. Alkalin Fosfataz boyama x40.



Şekil 4.73. Kontrol grubu, 60. günde gonad yapısı, poc: perinükleolar oosit, gd: gonad, PAS boyama x100.

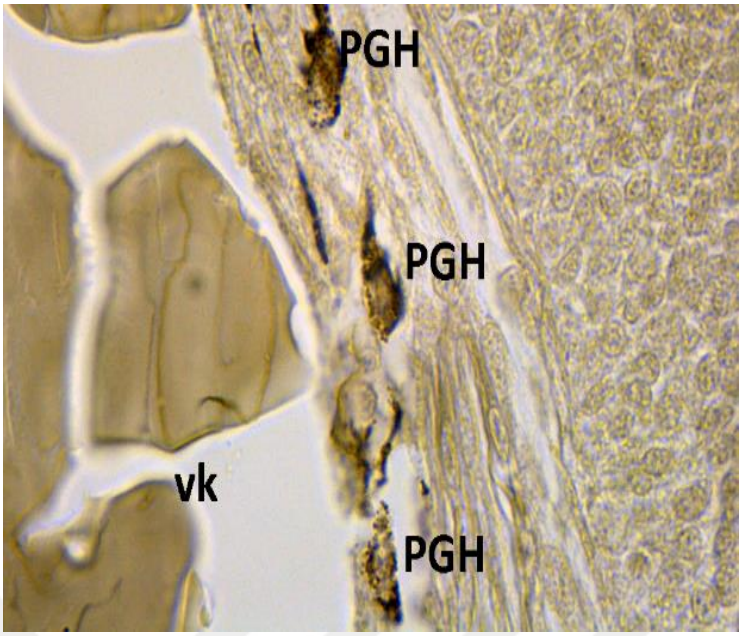


Şekil 4.74. Kontrol grubu, 60. günde gonad yapısı, poc: perinükleolar oosit, gd: gonad, Toluidin mavisi boyama, x100.

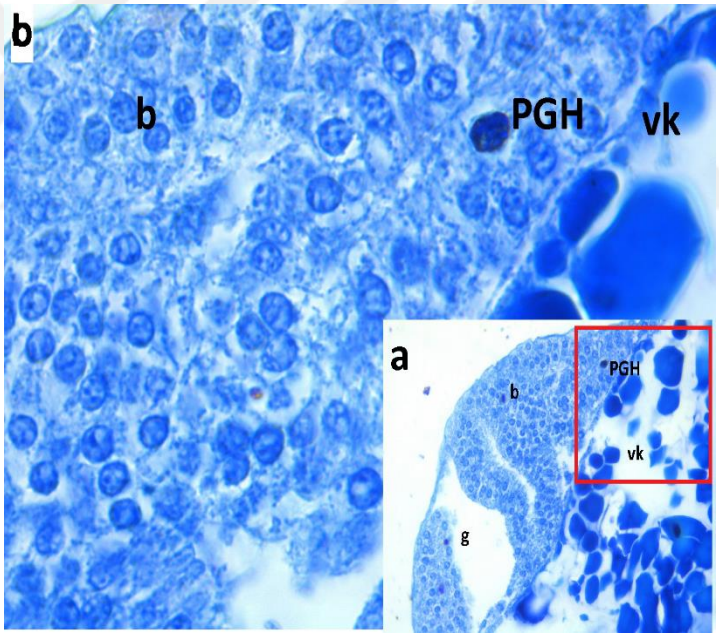
4.6.2. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış gruba ait embriyo ve larvalarda solungaç, kalp, karaciğer, özofagus ve ince barsakta gonad bölgesine doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Normal göç yolu haricinde, beyin, kuyruk, kas tabakası, böbrek, göz gibi bölgelerde göç yolundan sapmış (ektopik) primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Büyük nükleusa ve granüllü sitoplazmaya sahip primordiyal germ hücreleri, göç etmekte oldukları için genellikle iğ şeklinde ya da amorf idi. Bu gruba ait larvalardan alınan örnekler incelendiğinde, 0,25 mg/L LAS uygulamasının gonad farklılaşmasını ve ergin gonad oluşumunu geciktirdiği kanaatine varıldı.

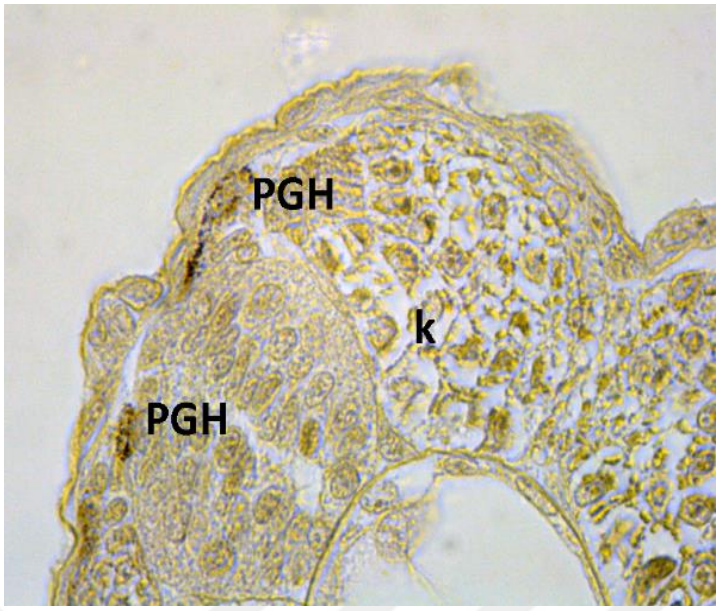
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 1. gününde ameboid hareketlerle göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinin dorsalinde tespit edildi (Şekil 4.75.). Embriyonun beyin (Şekil 4.76.) ve kuyrukta (Şekil 4.77.) yani ektopik bölgelerde de göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücrelerine rastlandı. 1. günde embriyonun dorsalinde, vitellüs kesesi ile somitler arasında konumlanması gereken primordiyal germ hücrelerinin 0,25 mg/L LAS uygulaması sonucunda göç yolundan ayrıldıkları tespit edildi.



Şekil 4.75. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

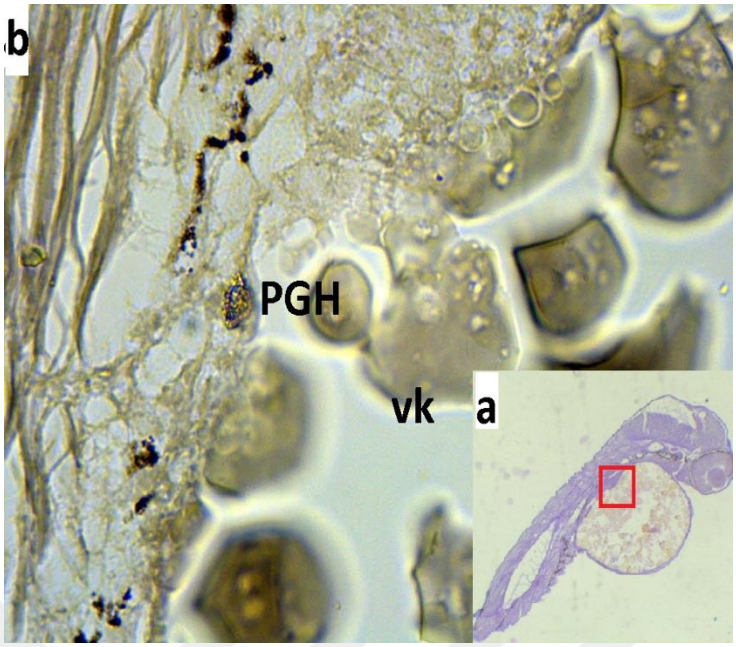


Şekil 4.76. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, b: beyin, g: göz, Toluidin mavisi boyama, a- x40, b-x100.

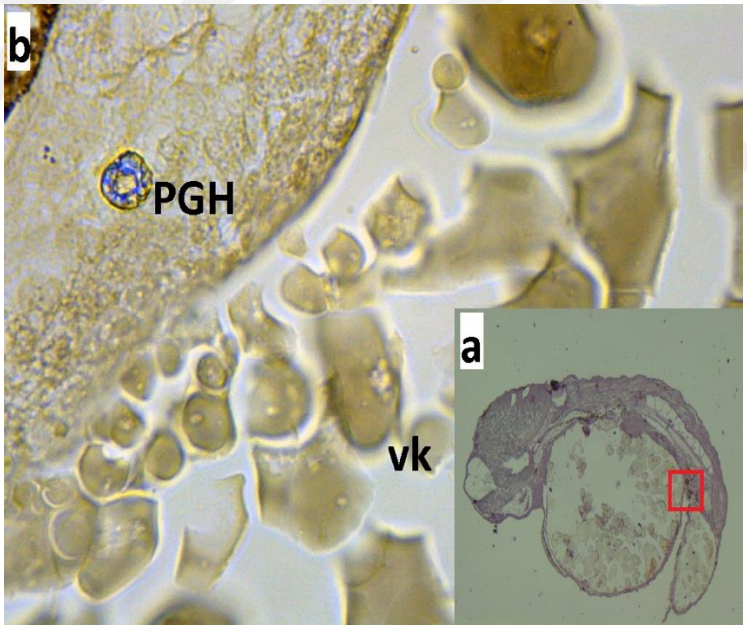


Şekil 4.77. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kuyruk, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

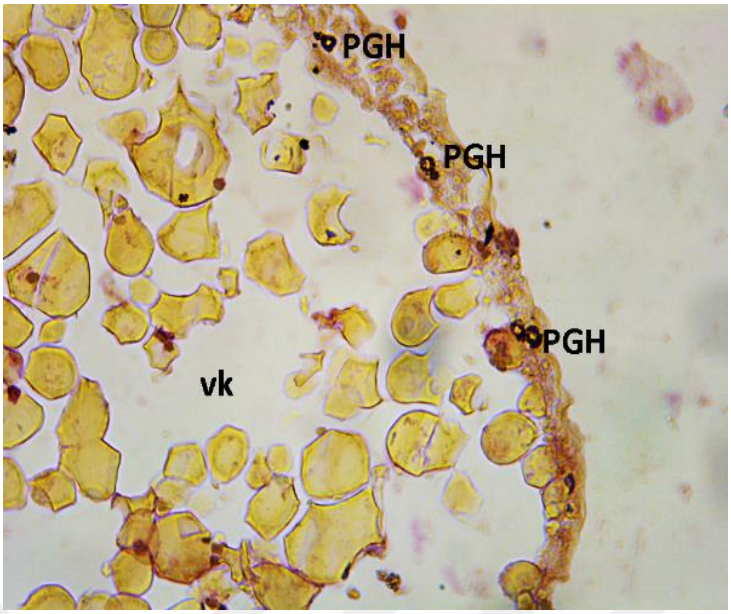
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 2. gününde, ektopik bölgelerde primordiyal germ hücrelerinin varlığı dikkat çekti. Vitellüs kesesinin dorsalinde (Şekil 4.78. ve Şekil 4.79.), ve ventralinde (Şekil 4.80.), beyinde, gözde (Şekil 4.81.) ve kuyrukta primordiyal germ hücreleri görüldü. Vitellus kesesi etrafında yuvarlak şekilli, beyinde iğ, kuyrukta ise amorf şekilli primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Yapılan tüm histolojik boyamalar sonucunda, bu hücrelerin bol granüllü sitoplazmaya sahip oldukları tespit edildi.



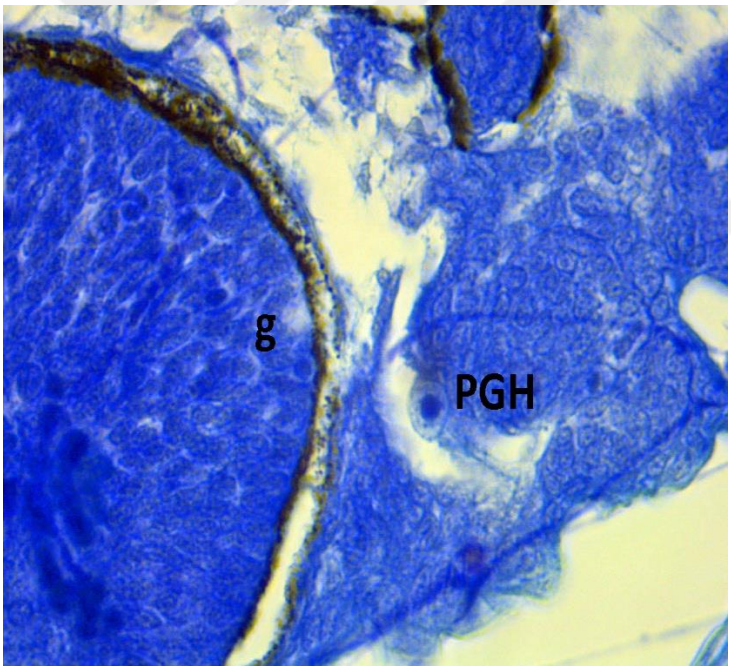
Şekil 4.78. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz ve PAS boyama, a-x10, b-x100



Şekil 4.79. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi dorsalinde tespit edilen primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz ve PAS boyama, a-x10, b-x100



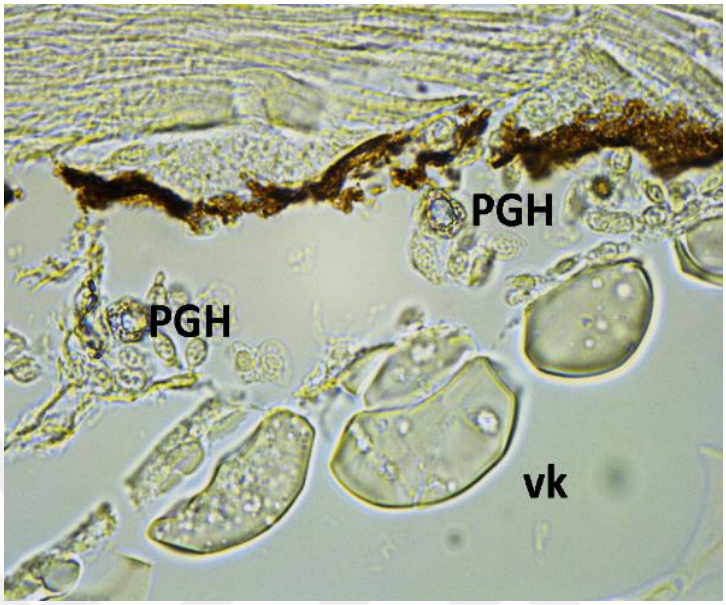
Şekil 4.80. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesi ventralinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, Best Carmin boyama, x40.



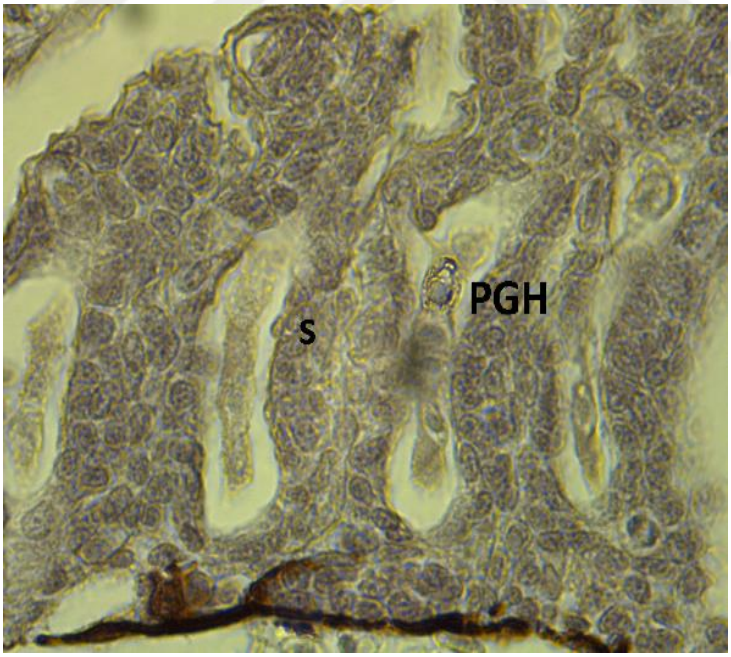
Şekil 4.81. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi, g: göz, PGH: primordiyal germ hücresi, Toluidin mavisi boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 3. gününde, vitellüs kesesinin dorsalinde (Şekil 4.82.), solungaç lamellerinde (Şekil 4.83.), özofagusta, kalpte, karaciğerde, primordiyal germ hücreleri görüldü. Ektopik bölgelerde göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri görüldü. Vitellus kesesinin ventralinde, gözde

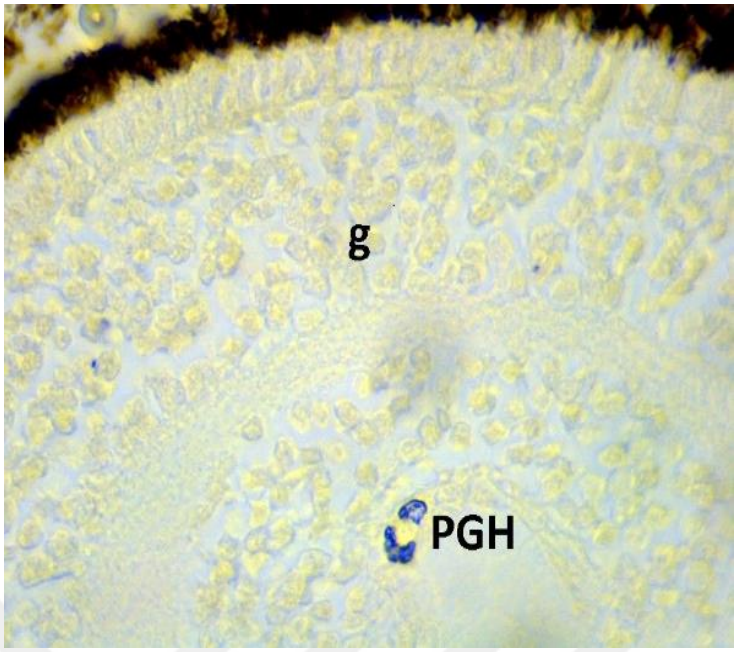
(Şekil 4.84.) ve somitlerin dorsalinde 0,25 mg/L LAS uygulamasına bağlı olarak göç yolundan saptığı düşünülen primordiyal germ hücreleri tespit edildi.



Şekil 4.82. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde vitellüs kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, vk: vitellus kesesi, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

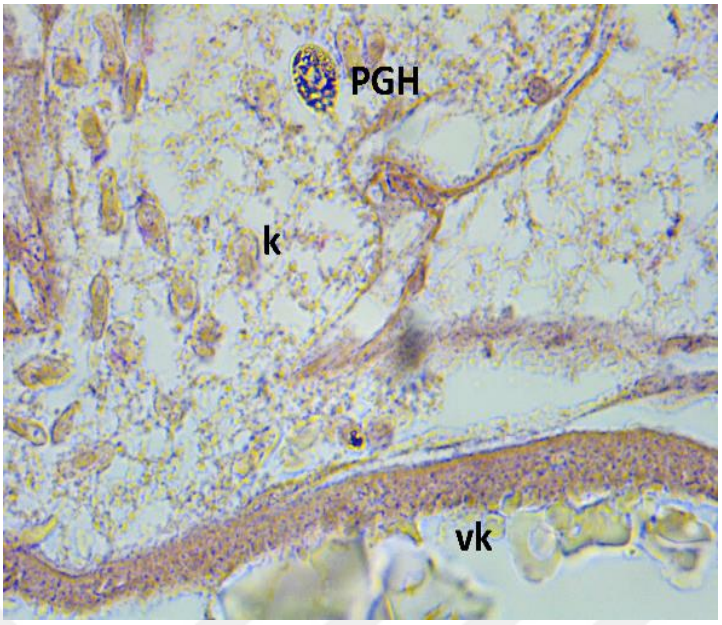


Şekil 4.83. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi, s: solungaç, PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, x100.

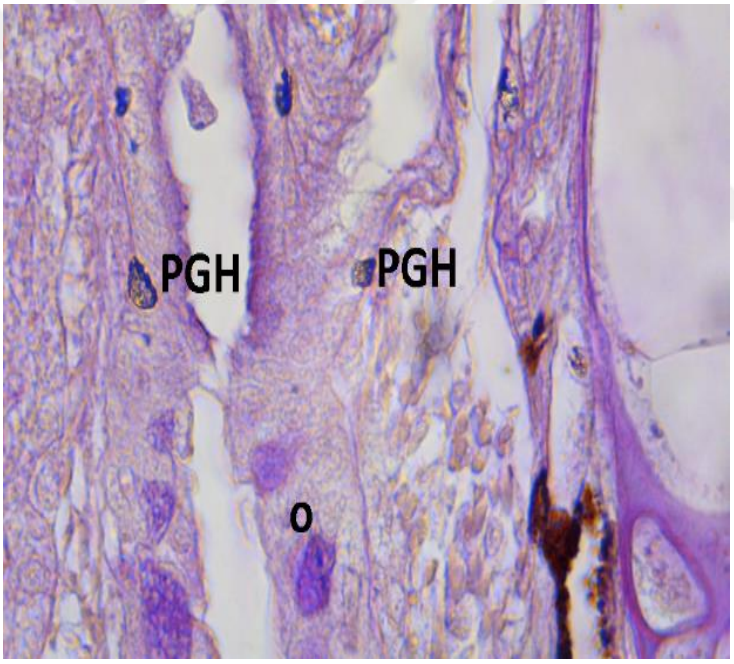


Şekil 4.84. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi. g: göz, PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

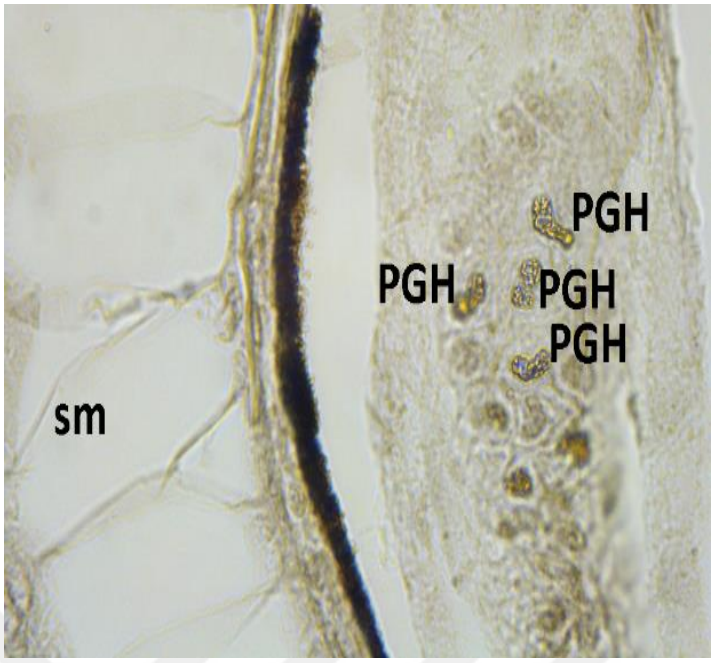
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 5. gününde kalpte (Şekil 4.85.), özofagusta (Şekil 4.86.), vitellüs kesesi ile somitlerin arasında (Şekil 4.87.) ve ektopik olarak ise beyinde (Şekil 4.88.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Bol granüllü ve iri nükleuslu bu hücrelerin sitoplazmalarında yüksek alkalin fosfataz aktivitesi görüldü.



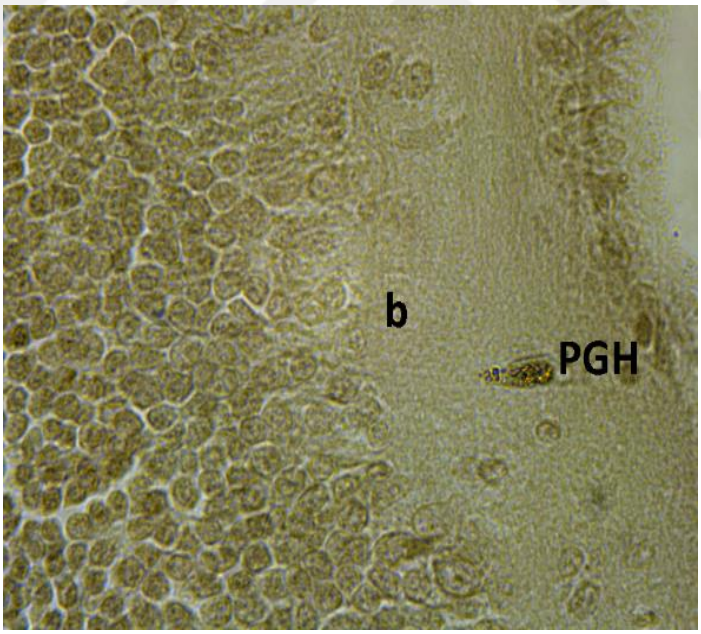
Şekil 4.85. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, k: kalp, Best Carmin boyama, x100.



Şekil 4.86. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama, x100.



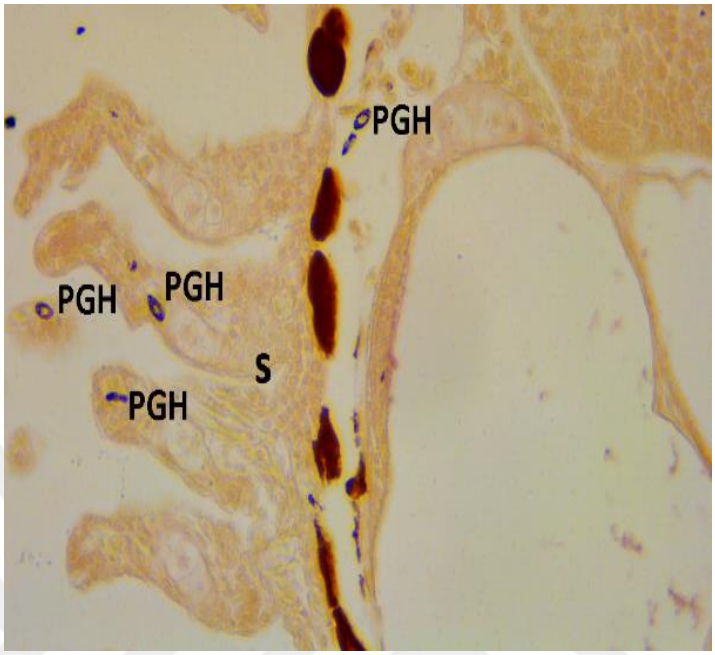
Şekil 4.87. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde somitler ile vitellüs kesesi arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, sm: somit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



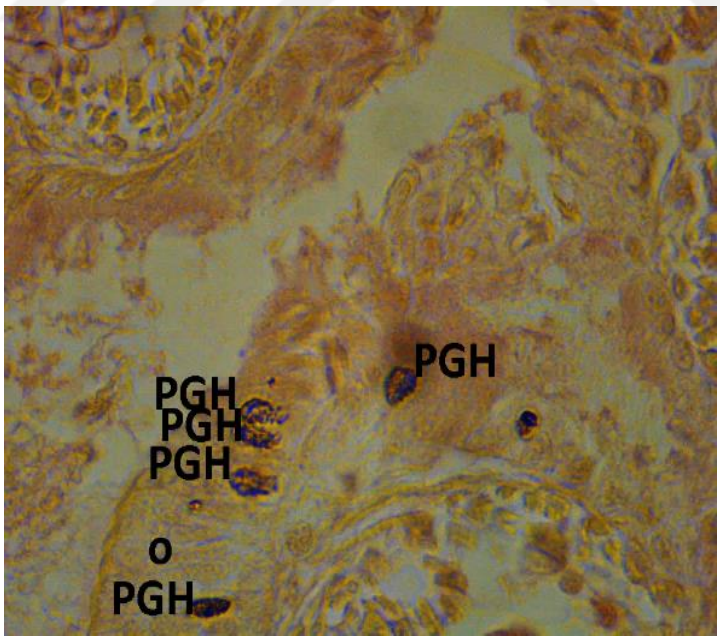
Şekil 4.88. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin Alkalin Fosfataz boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 7. gününde kalpte, solungaç lamellerinde (Şekil 4.89.), özofagusta (Şekil 4.90.) ve ince barsakta göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edilmiştir. Göç ettikleri için iğ şeklinde olan bu

hücreler, glikojen tanelerini iyi bir şekilde boyayan Best Carmin boyası ile net bir şekilde görüntülenmiştir.



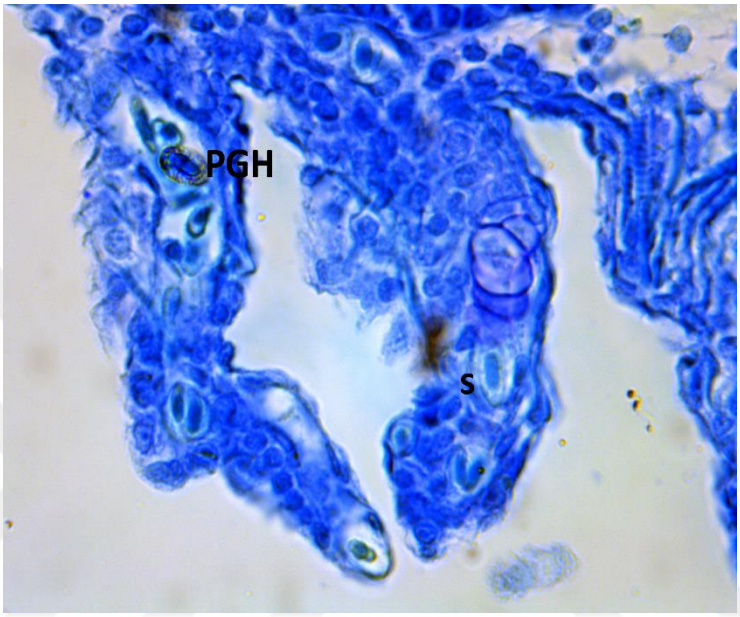
Şekil 4.89. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi: solungaç, Best Carmin boyama x40.



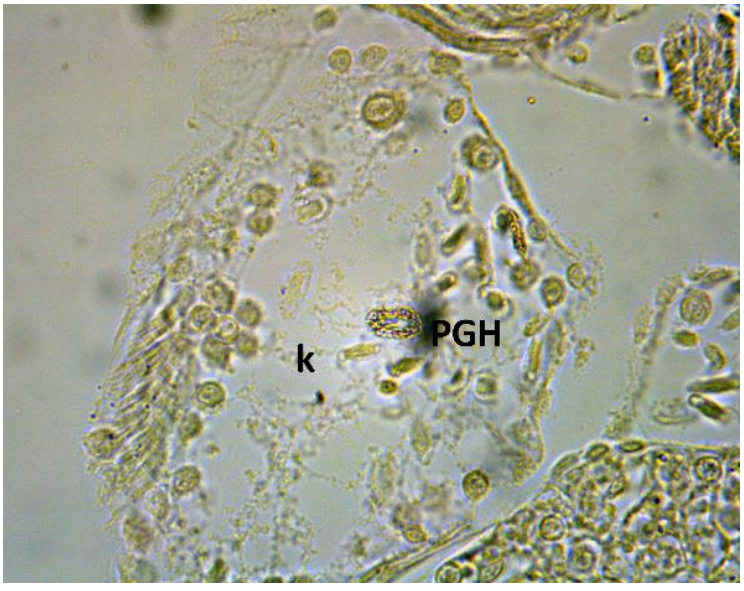
Şekil 4.90. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, Best Carmin boyama x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 10. gününde solungaç lamellerinde (Şekil 4.91.), kalpte (Şekil 4.92.), karaciğerde, özofagusta, ince barsakta

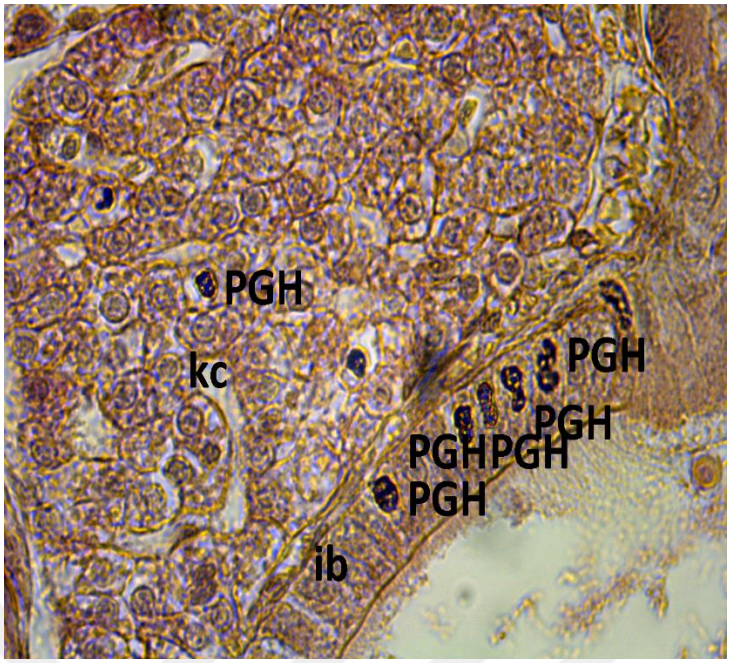
(Şekil 4.93.) primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Ektopik olarak ise, beyinde göç yolundan sapmış çok sayıda primordiyal germ hücresi tespit edildi (Şekil 4.94.). Bu hücreler, sitoplazmalarında elektronca yoğun madde (nuage materyali) içerdiklerinden, katyonik bir boya olan Toluidin mavisi ile spesifik olarak boyanıp, ışık mikroskobu altında görüntülendiler.



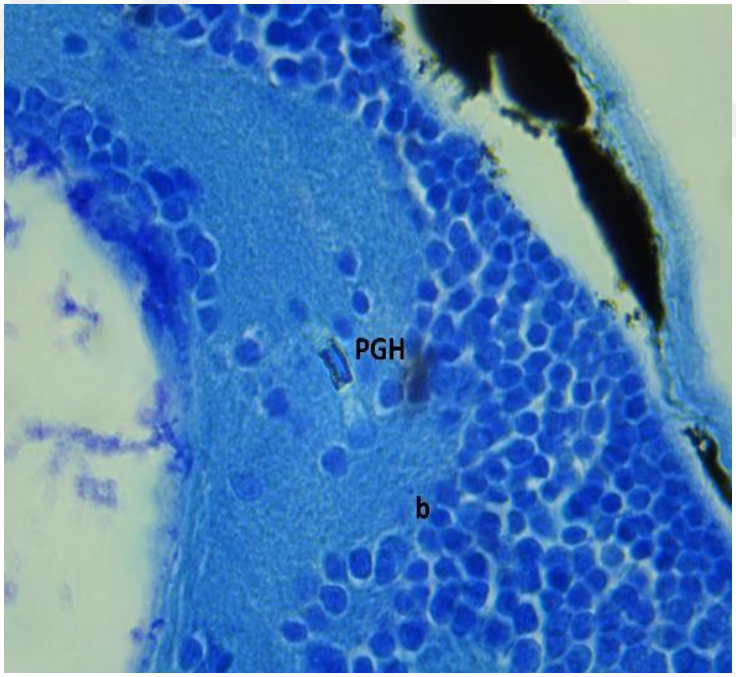
Şekil 4.91. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s:solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.92. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



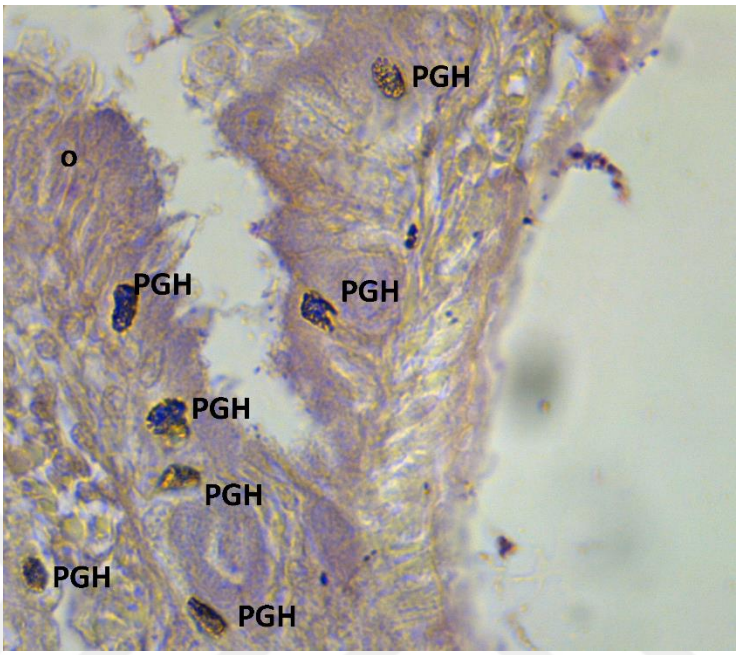
Şekil 4.93. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, kc: karaciğer, Best Carmin boyama, x100.



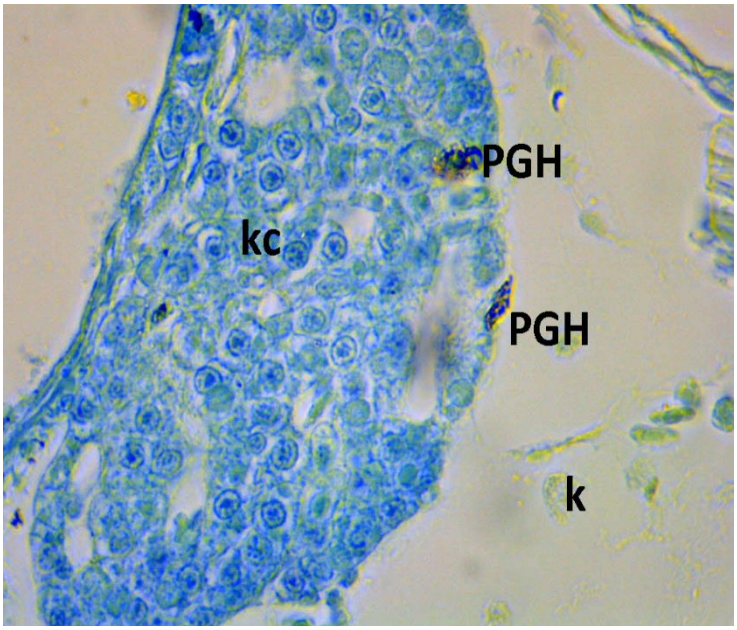
Şekil 4.94. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Toluidin mavisi boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 12. gününde, özofagusta (Şekil 4.95.), karaciğerde (Şekil 4.96.), ince barsakta ve ektopik olarak beyinde primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 13. günde ise özofagusta, karaciğerde (Şekil 4.97.), ince

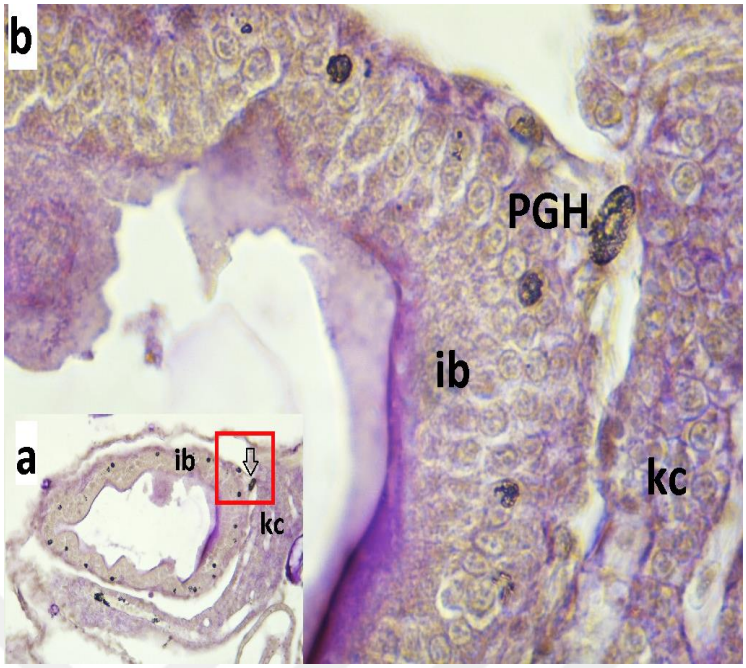
barsakta ve gonadal bölgede primordiyal germ hücreleri tespit edildi (Şekil 4.98.). Gonadal bölgede ilkel bir gonad taslağı izlendi. Primordiyal germ hücrelerinin gametogonyumlara farklılaşmaya başladığı gözlendi.



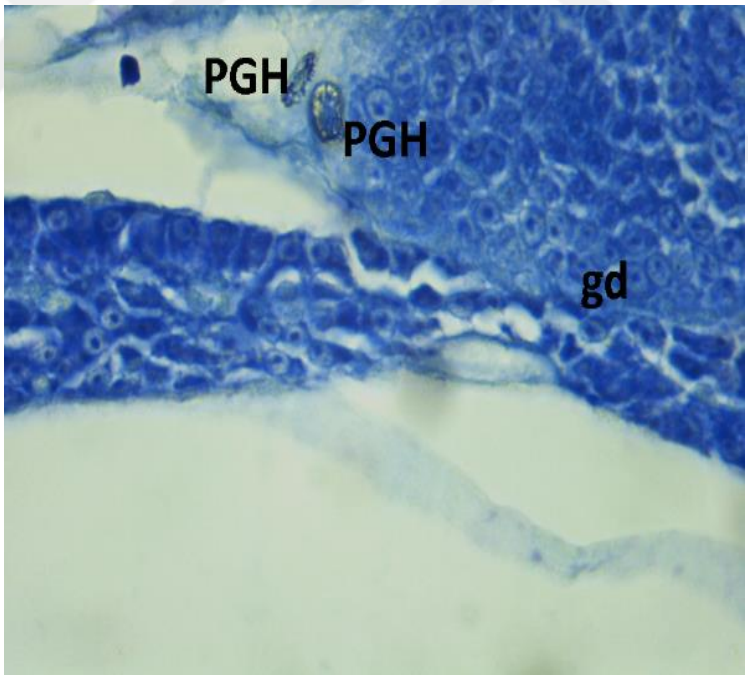
Şekil 4.95. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama x100.



Şekil 4.96. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, kc: karaciğer, Toluidin mavisi boyama x100.



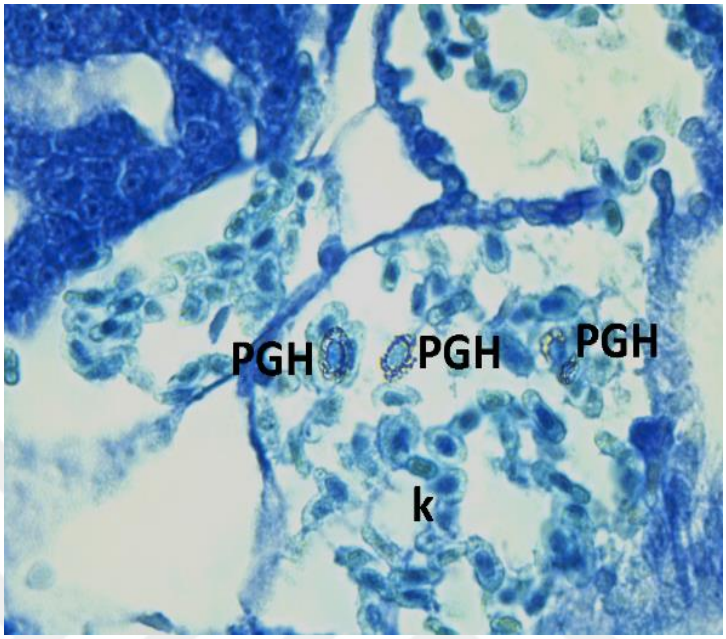
Şekil 4.97. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, kc: karaciğer, PAS boyama a-x40, b-x100.



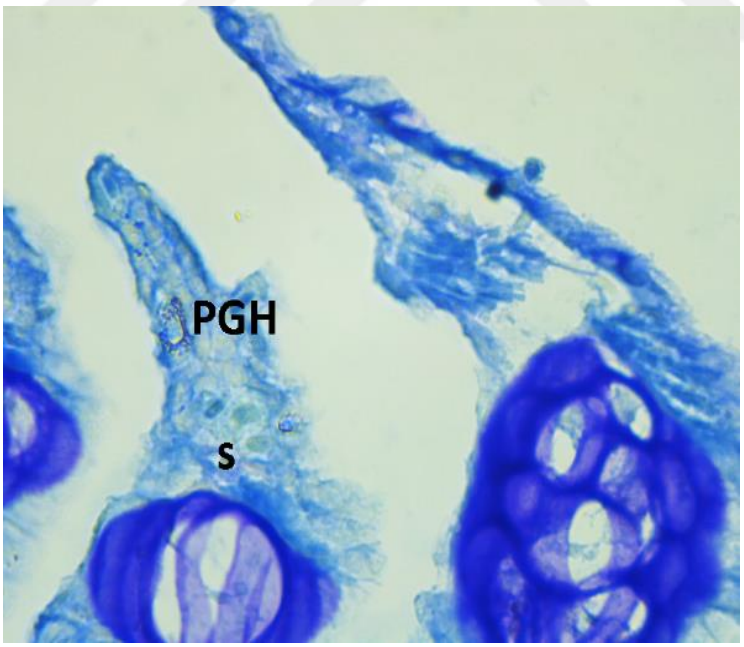
Şekil 4.98. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, Toluidin mavisi boyama x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 16. gününde, kalpte (Şekil 4.99.), karaciğerde, solungaçlarda (Şekil 4.100.), özofagusta, ince barsakta, somitlerin kenarında primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Ektopik olarak ise kuyrukta (Şekil 4.101.) ve kas tabakasında (Şekil 4.102.) primordiyal germ hücreleri izlendi. 17. günde

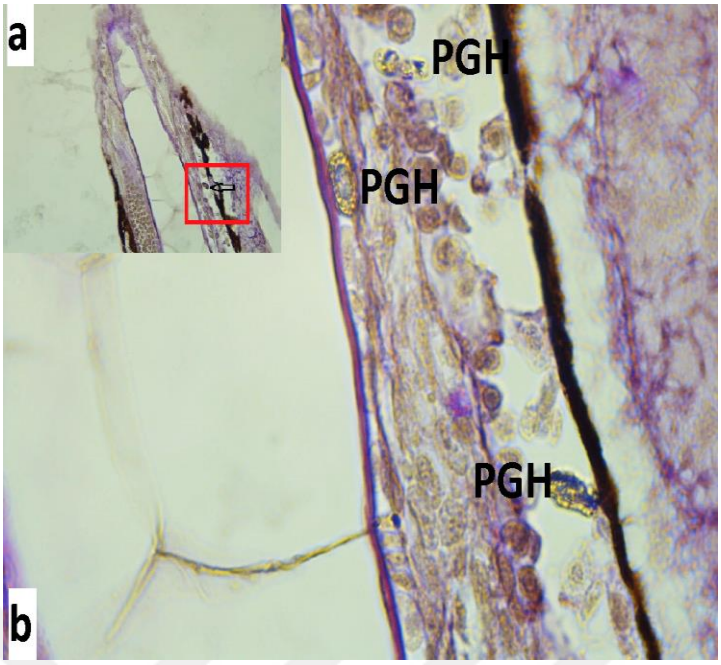
de benzer bölgelerde primordiyal germ hücrelerine rastlandı (Şekil 4.103.). Ektopik olarak beyinde ve göz kenarında primordiyal germ hücreleri gözlendi (Şekil 4.104.).



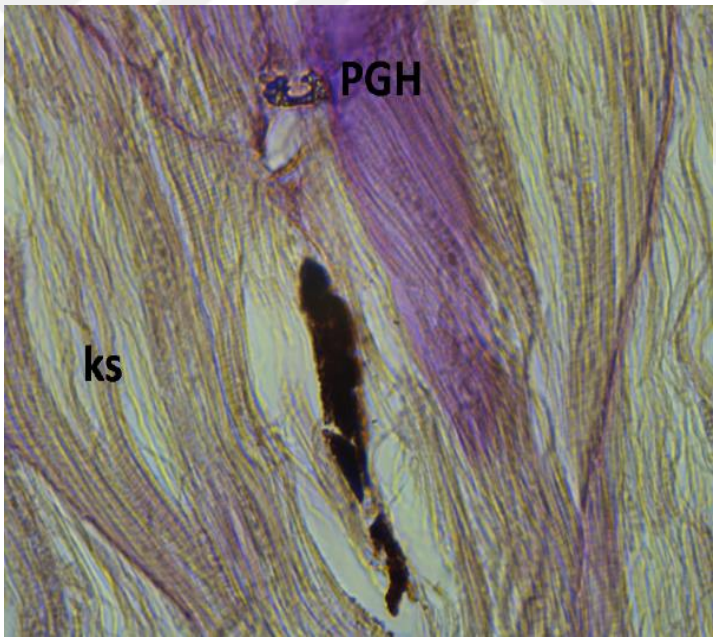
Şekil 4.99. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.



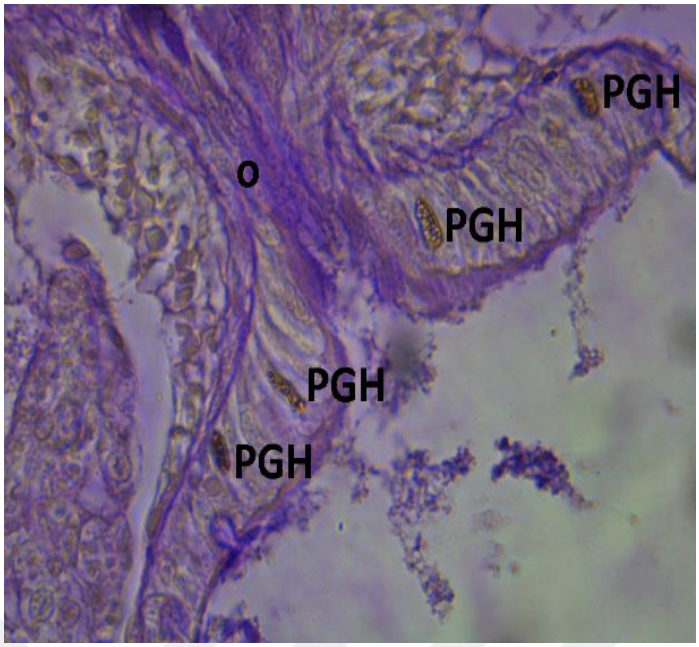
Şekil 4.100. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



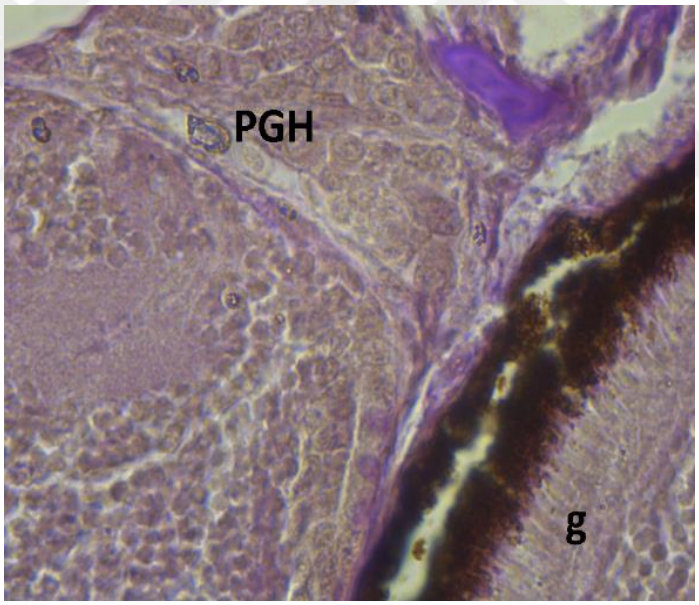
Şekil 4.101. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, a-40, b-x100.



Şekil 4.102. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kas tabakasında gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, ks: kas tabakası, PAS boyama x100.



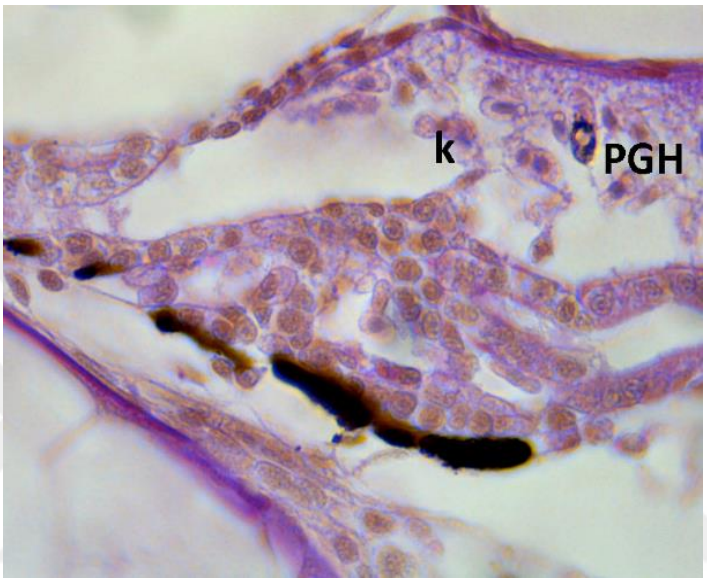
Şekil 4.103. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, g: göz, PAS boyama, x100.



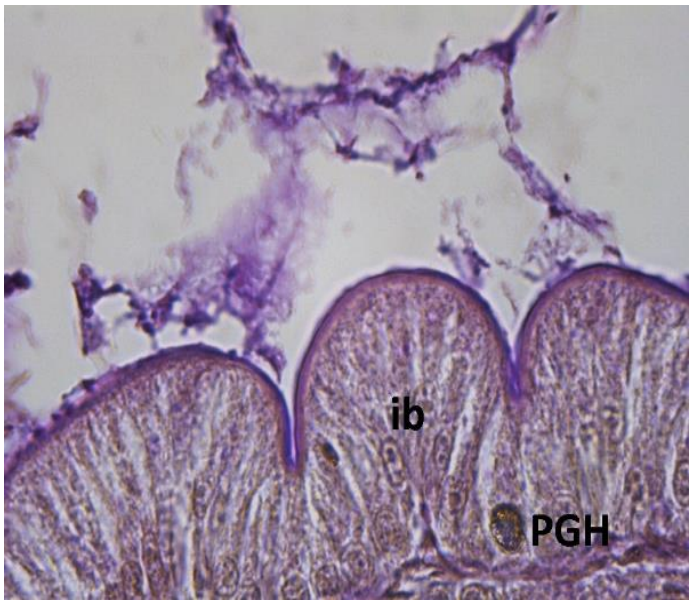
Şekil 4.104. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde beyinde görülen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 19. gününde, kalpte (Şekil 4.105.) ve ince barsakta (Şekil 4.106.) primordiyal germ hücreleri gözlendi. Bu hücrelerin, sitoplazmalarında bulunan glikojen taneleri sayesinde PAS boyası ile spesifik olarak boyandıkları tespit edildi. 25. günde ise kalpte (Şekil 4.107.), özofagusta, karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.108.) gonad taslaklarına doğru göç

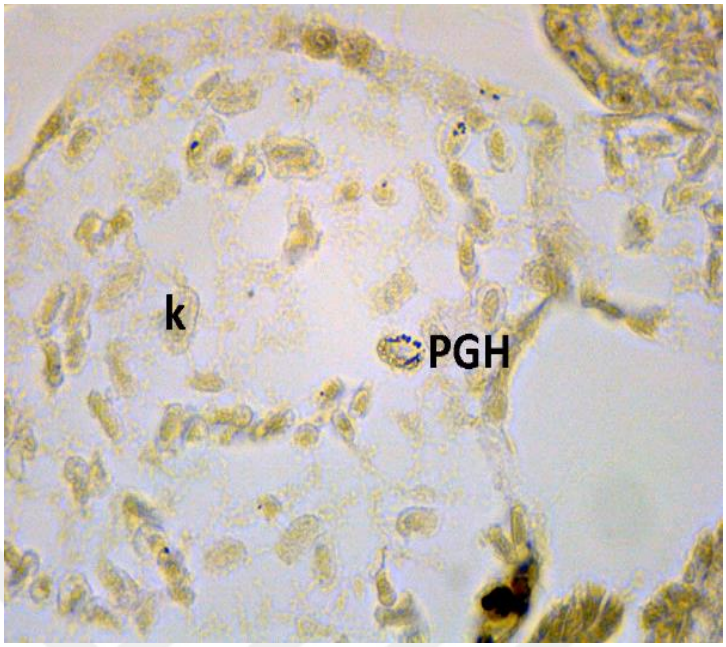
etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısında ise farklılaşmanın başladığı görüldü. Gametogonyumların (goniyal hücrelerin) yanı sıra, bazofilik karyoplazmaya, büyük çekirdeğe ve birden fazla çekirdekçiğe sahip tip 1 germ hücreleri ile boyutça tip 1 germ hücrelerinden büyük olan ve karyoplazmada dağılmış kromatin iplikleri içeren tip 2 germ hücreleri belirgin bir şekilde görüntülendi (Şekil 4.109.).



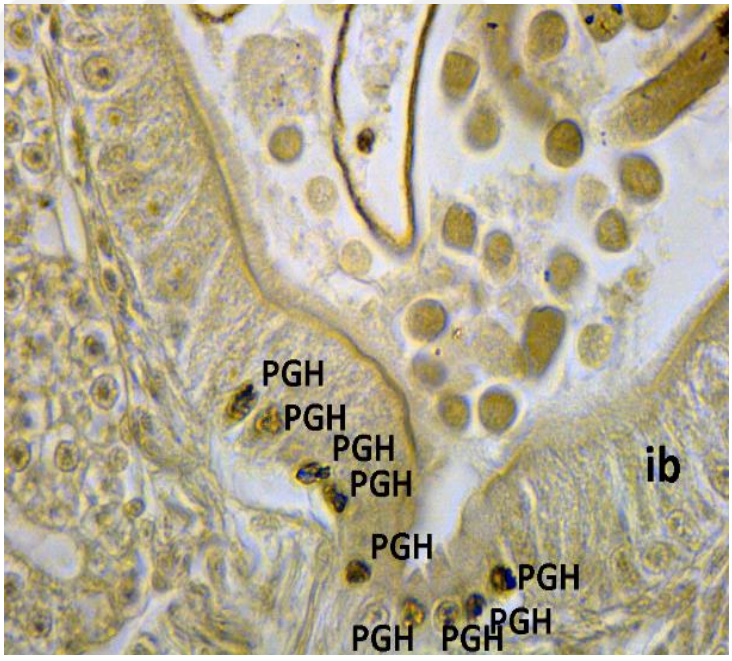
Şekil 4.105. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, PAS boyama, x100.



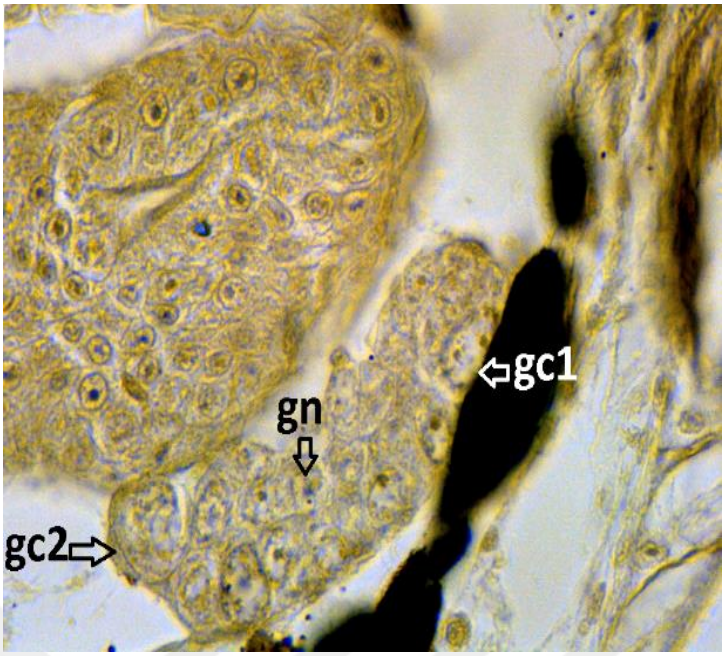
Şekil 4.106. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, ib:ince barsak, PAS boyama, x100.



Şekil 4.107. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

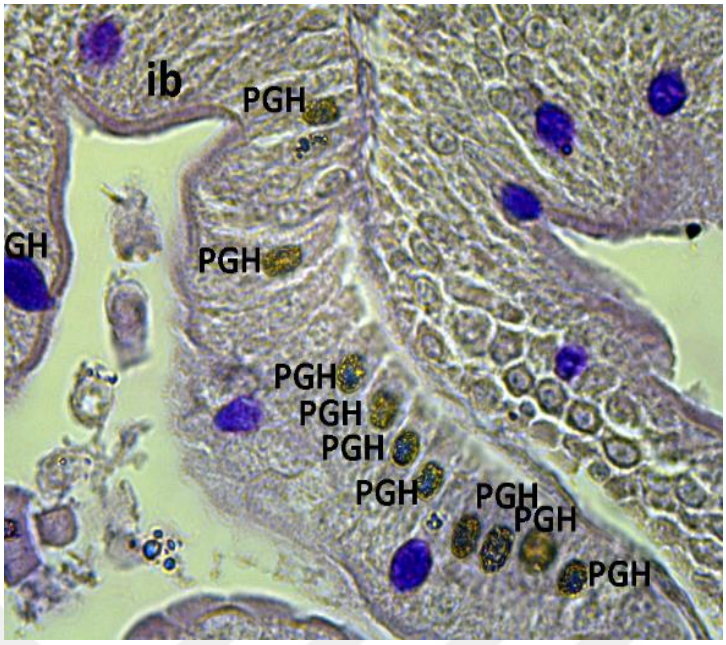


Şekil 4.108. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: solungaç, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.109. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, Alkalin fosfataz boyama, x100.

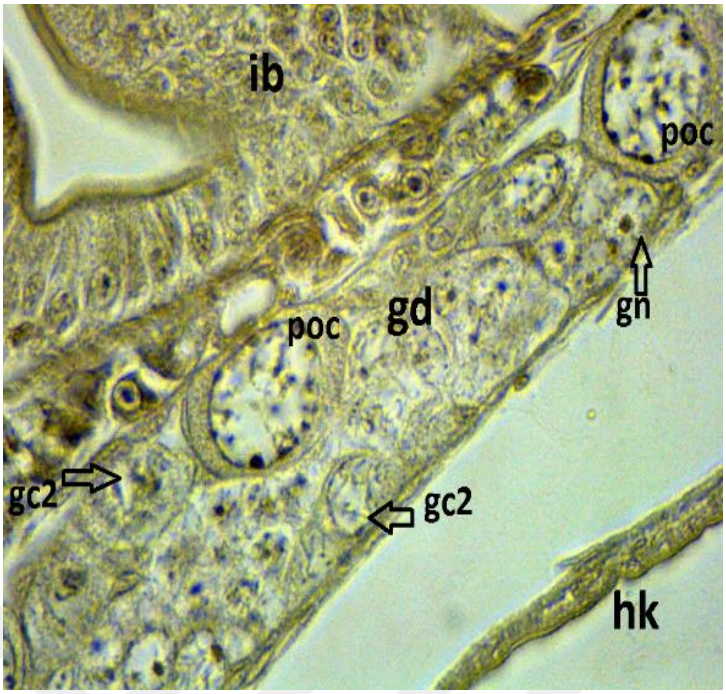
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta 29. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, özofagusta, karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.110.) primordiyal germ hücreleri görüntülendi. 0,25 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan sapan ektopik primordiyal germ hücrelerine gözde (Şekil 4.111.) ve böbrekte rastlandı. Gonad yapısının ise önceki günlere göre daha geliştiği tespit edildi. Gonadlarda tip 2 germ hücreleri ile bazofilik sitoplazmaya ve karyoplazma etrafında pek çok çekirdekçiğe sahip olan perinükleolar oositler görüntülendi (Şekil 4.112.).



Şekil 4.110. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100.

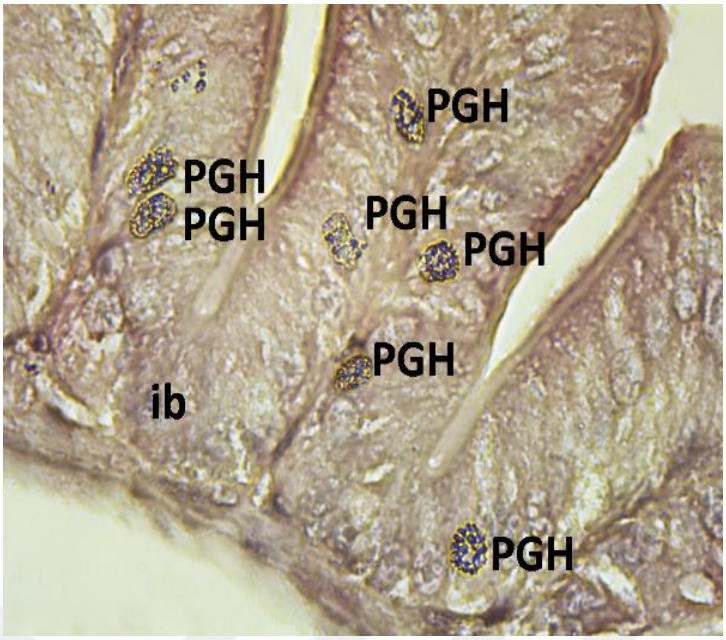


Şekil 4.111. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x40.

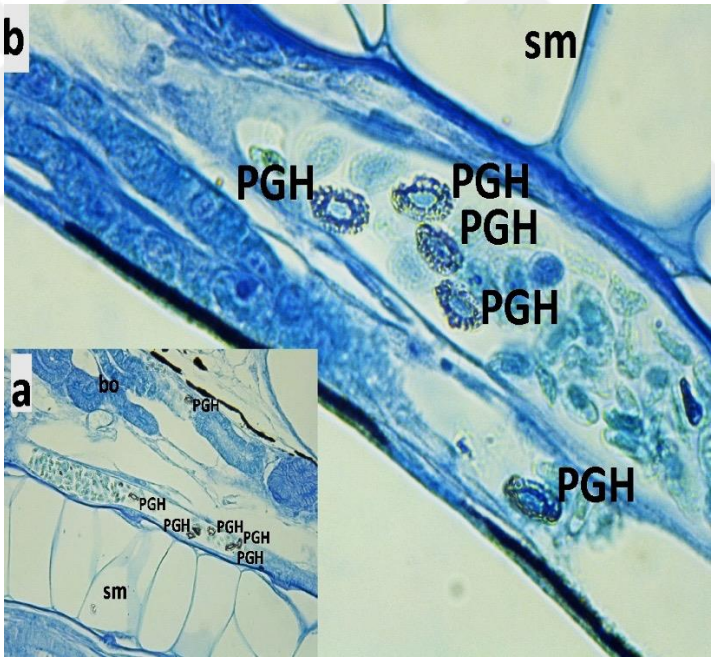


Şekil 4.112. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde gonad yapısı. ib: ince barsak, gd: gonad, gn: goniyal hücre, gc2: tip 2 germ hücresi, poc: perinükleolar oosit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

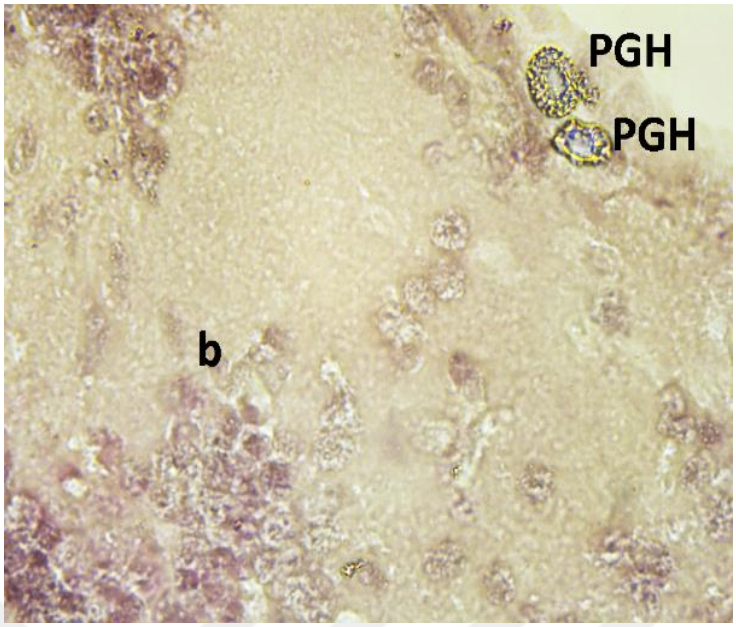
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 33. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, özofagusta, karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.113.) primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Diğer günlerde olduğu gibi 33. günde alınan örneklerde de göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri görüldü. Böbreklerde, böbrekler ile somitler arasında (Şekil 4.114.), beyinde (Şekil 4.115.) ve kuyrukta primordiyal germ hücreleri tespit edildi.



Şekil 4.113. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücreleri, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.

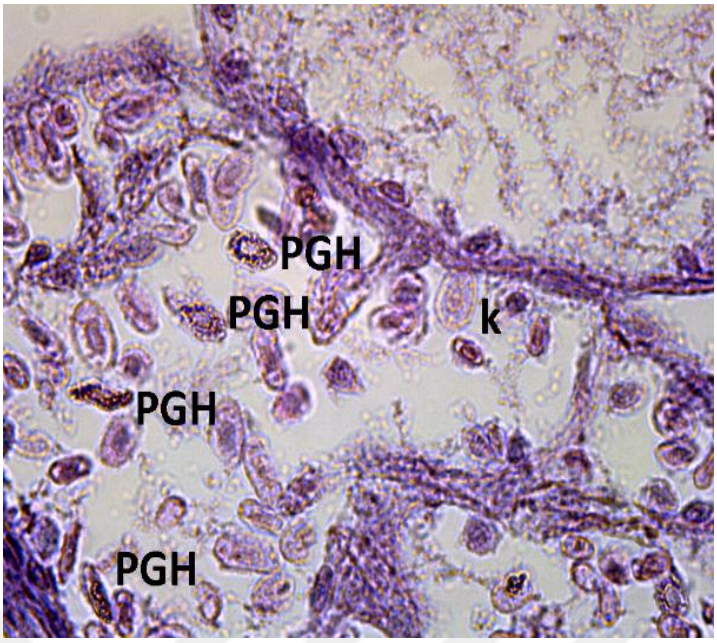


Şekil 4.114. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde somitler ile böbrek arasında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, sm: somit, bo: böbrek, Toluidin mavisi boyama, a-x40, b-x100.

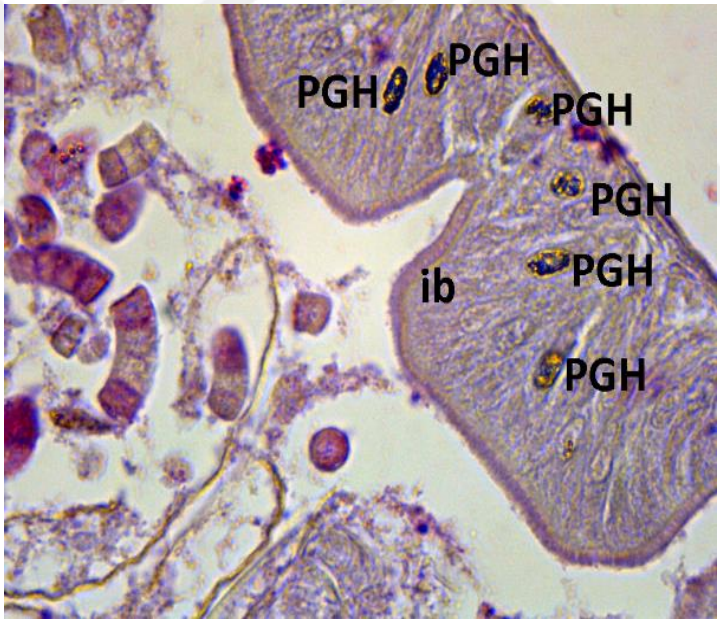


Şekil 4.115. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, x100.

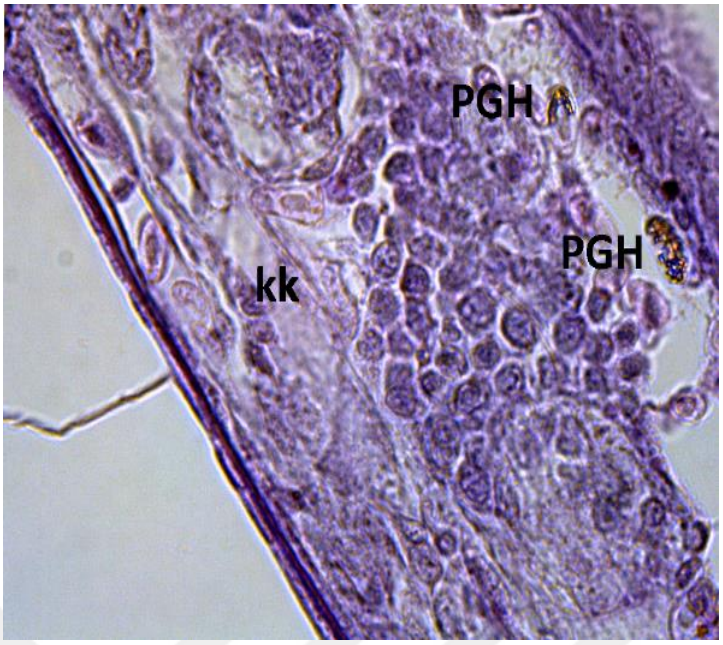
0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 37. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte (Şekil 4.116.), özofagusta, karaciğerde, ince barsakta (Şekil 4.117.) ve ektopik olarak kuyrukta (Şekil 4.118.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Büyük nükleusa ve bol granüllü sitoplazmaya sahip bu hücrelerin iğ şeklinde oldukları, PAS boyası ile spesifik bir şekilde boyandıkları görüldü. Gonad yapısının küçük bir kısmında farklılaşmanın başladığı görüldü. Goniyal hücreler ile tip 2 germ hücreleri gözlendi (Şekil 4.119.).



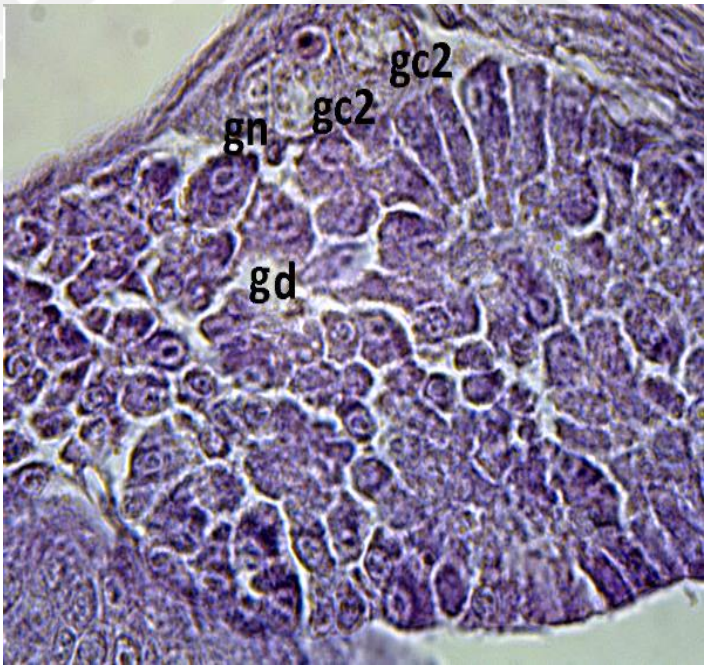
Şekil 4.116. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, PAS boyama, x100.



Şekil 4.117. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100.



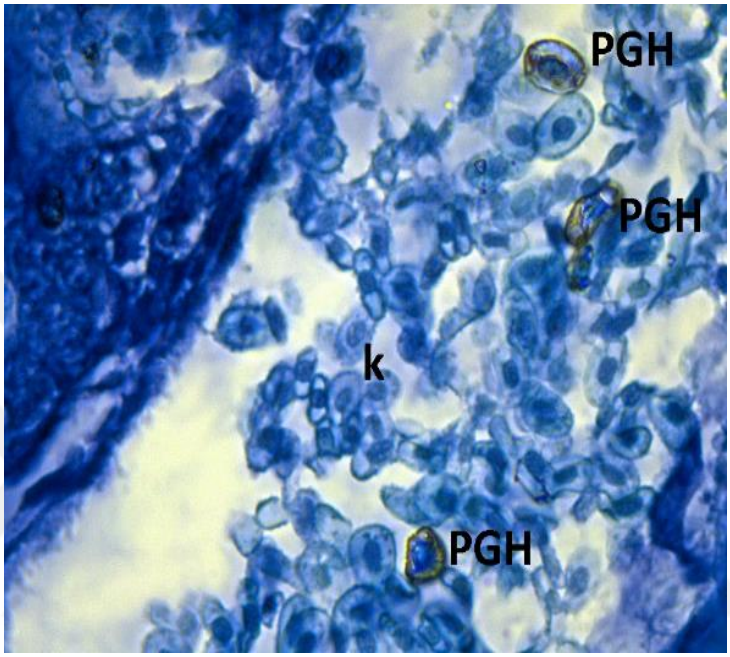
Şekil 4.118. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, PAS boyama, x100.



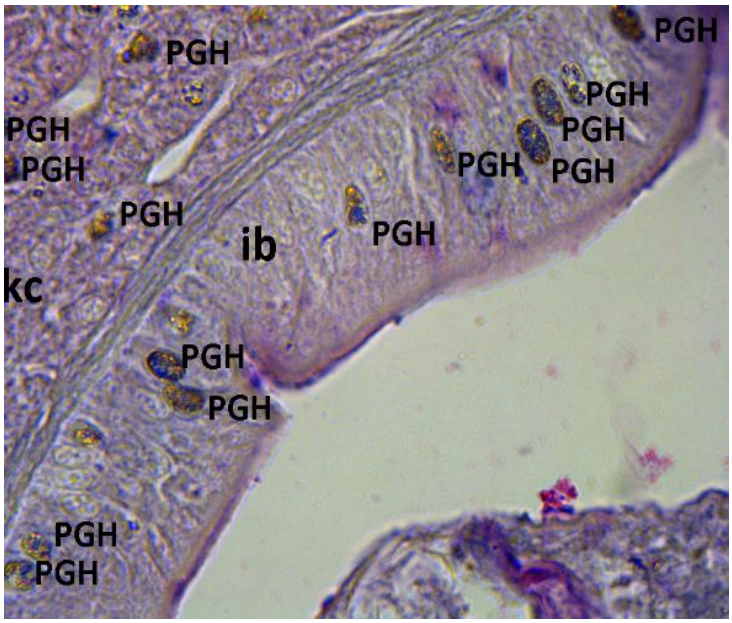
Şekil 4.119. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısı, gd: gonad, gn: goniyal hücre, gc2: tip 2 germ hücresi, PAS boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 42. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte (Şekil 4.120.), karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.121.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Göç yolundan sapan primordiyal germ hücrelerinden bazıları beyin dokusunda görüldü (Şekil 4.122.). Gonad yapısının ise

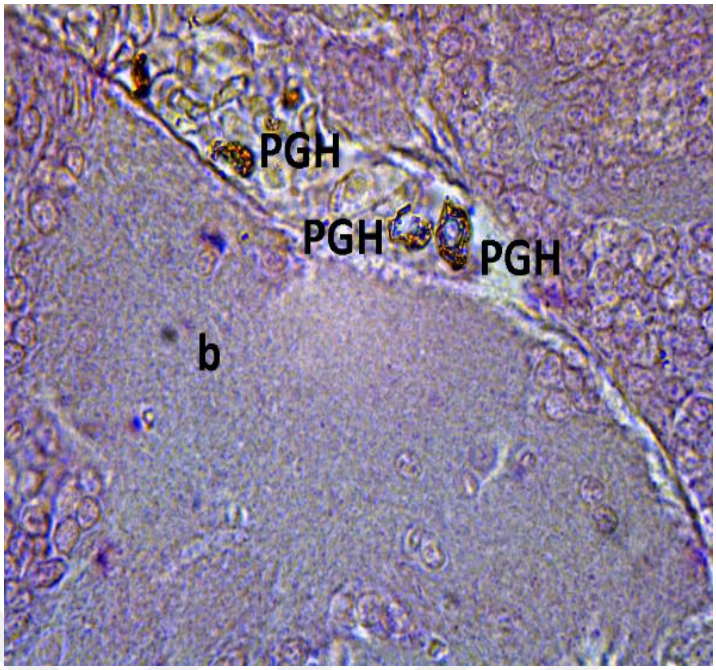
önceki günlere göre daha geliştiği, hücrelerde mitotik ve mayotik aktivitelerin başladığı gözlendi. Gonadlarda goniyal hücreler, tip 2 germ hücreleri ve perinükleolar oositler görüntülendi. Buna rağmen, kontrol grubu ile kıyaslandığında gonadal farklılaşmanın gerçekleşmediği tespit edildi. Dolayısıyla gonad yapısına bakılarak cinsiyet tayini yapılamadı (Şekil 4.123.).



Şekil 4.120. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.121. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, ib: ince barsak, PAS boyama, x40.



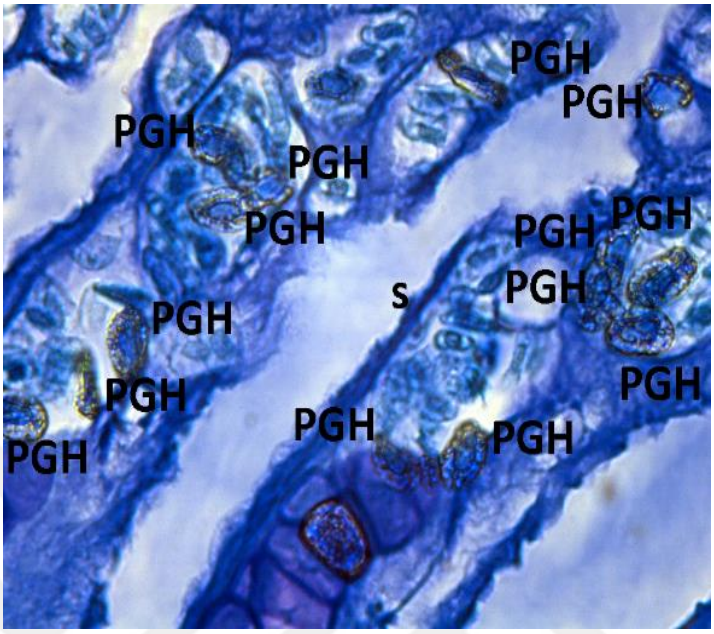
Şekil 4.122. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, PAS boyama, x40.



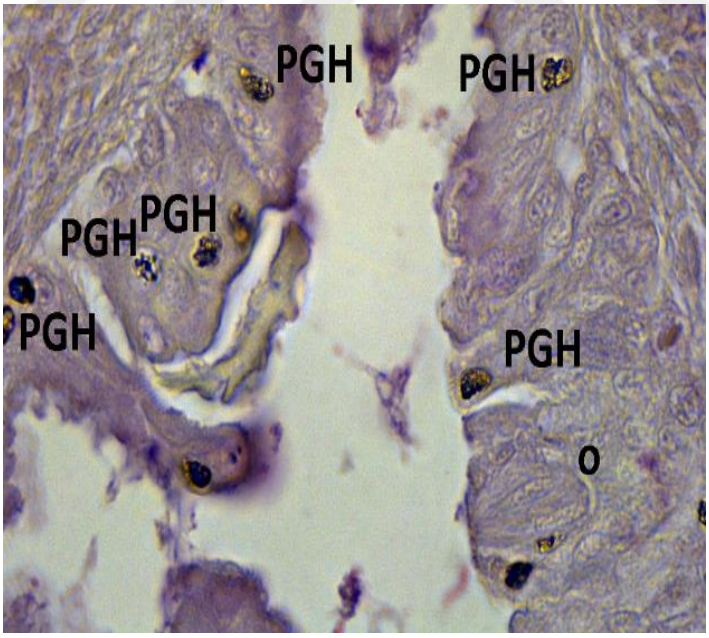
Şekil 4.123. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı. gd: gonad, poc: perinükleolar oosit, gc2: tip 2 germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 47. gününde solungaçta (Şekil 4.124.), karaciğerde, özofagusta (Şekil 4.125.) ve ince barsakta primordiyal germ hücreleri görüldü. Ektopik olarak ise alt çenede, böbrekte, omurganın ventralinde, beyinde, gözde (Şekil 4.126.) ve kuyrukta göç yolundan sapmış primordiyal germ

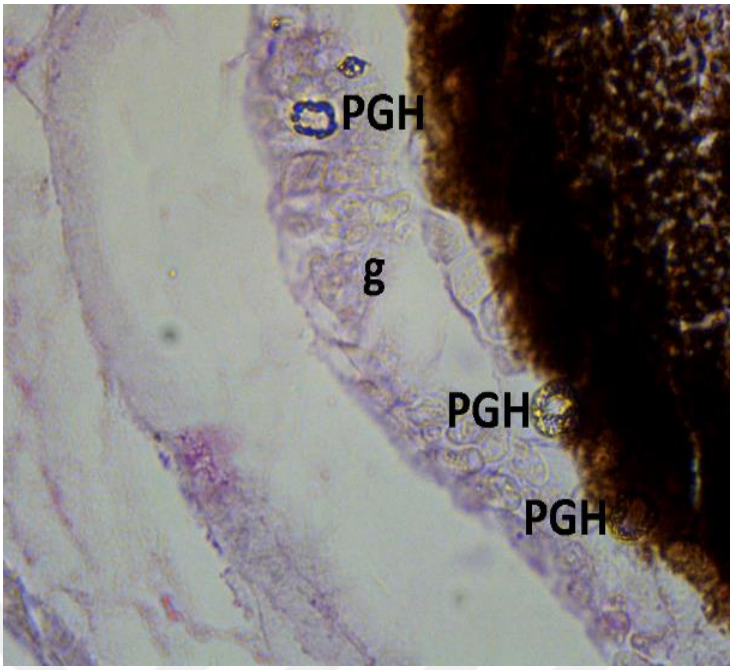
hücreleri tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla gonad yapısının yeterince gelişemediği görüldü. Gonadal bölgede dejenere olmuş goniyal hücreler tespit edildi (Şekil 4.127.).



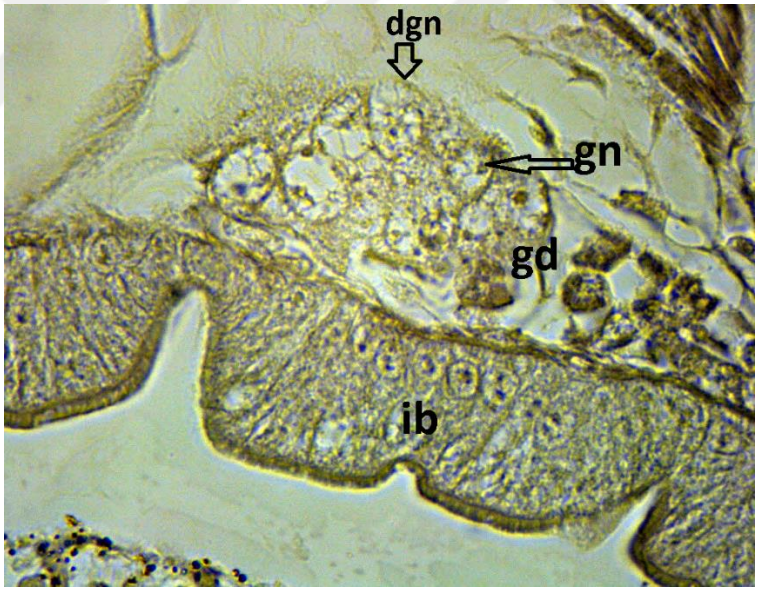
Şekil 4.124. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.125. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama, x40.



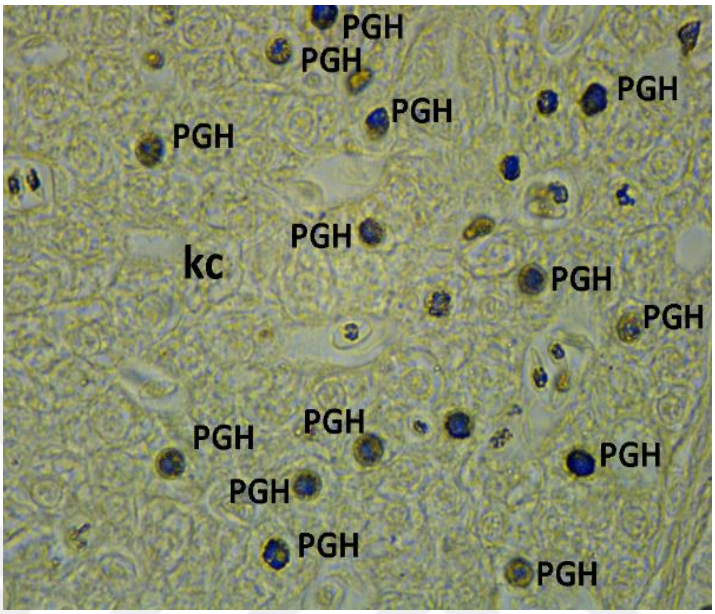
Şekil 4.126. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x100.



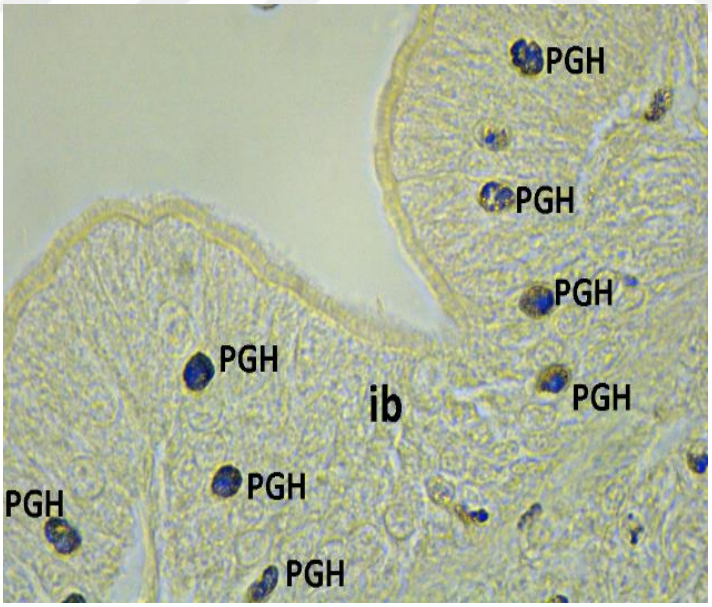
Şekil 4.127. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, dgn: dejenere olmuş goniyal hücre, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 52. gününde, solungaçta, kalpte, karaciğerde (Şekil 4.128.), ince barsakta (Şekil 4.129.) ve gonadal bölgede gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan yuvarlak şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 0,25 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan sapan primordiyal germ hücrelerine kas tabakasında ve beyinde (Şekil 4.130.) rastlandı. Gonad yapısının 47.

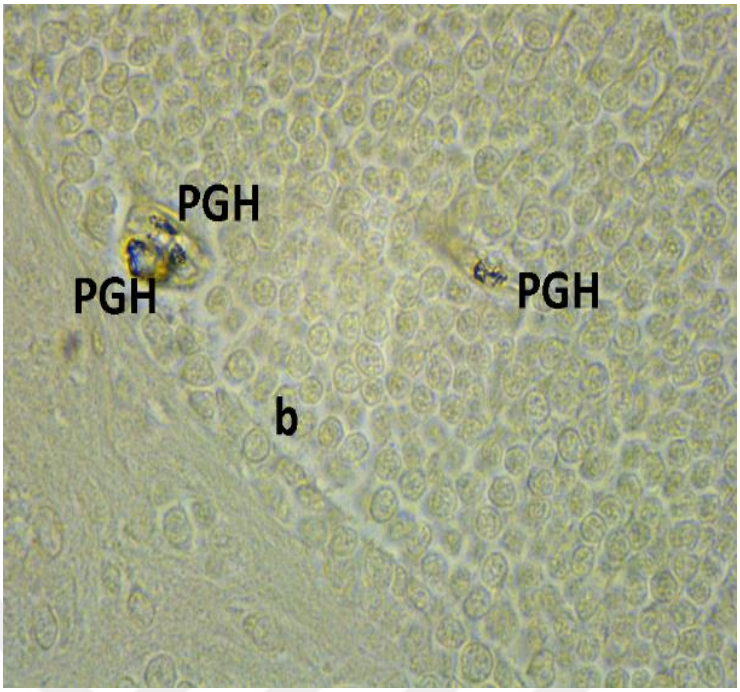
güne benzer olduğu görüldü. Kontrol grubuna kıyasla daha ilkel bir gonad yapısının olduğu gözlendi. Gonad yapısının testis ya da ovaryum yönünde farklılaşmadığı tespit edildi. Goniyal hücreler ve az sayıda perinükleolar oosit görüntülendi (Şekil 4.131.).



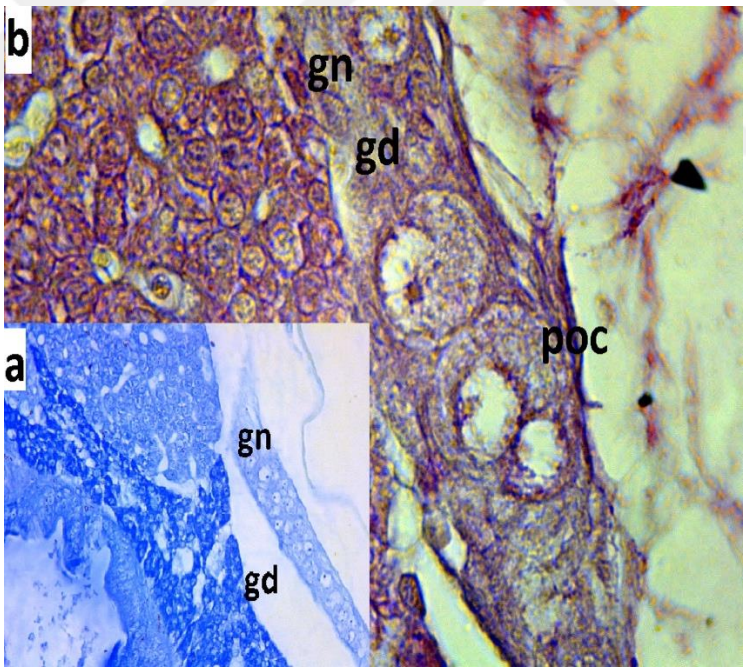
Şekil 4.128. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.129. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



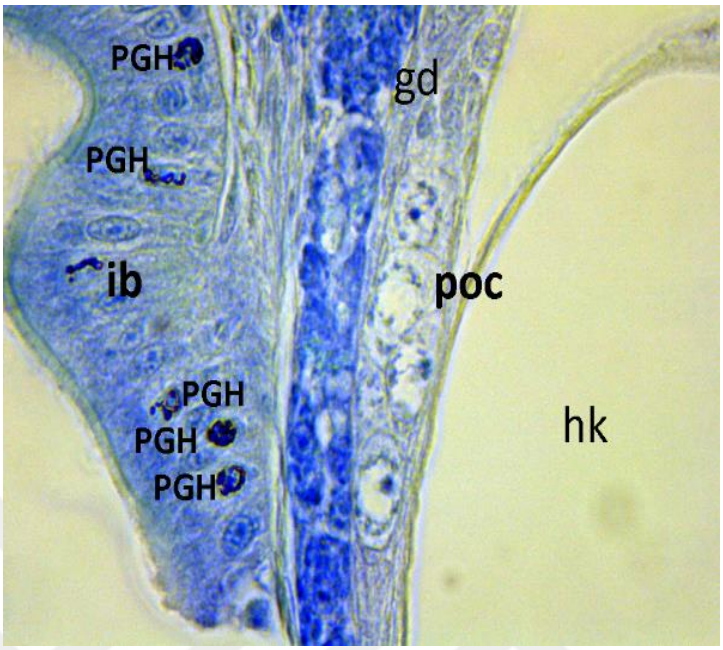
Şekil 4.130. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



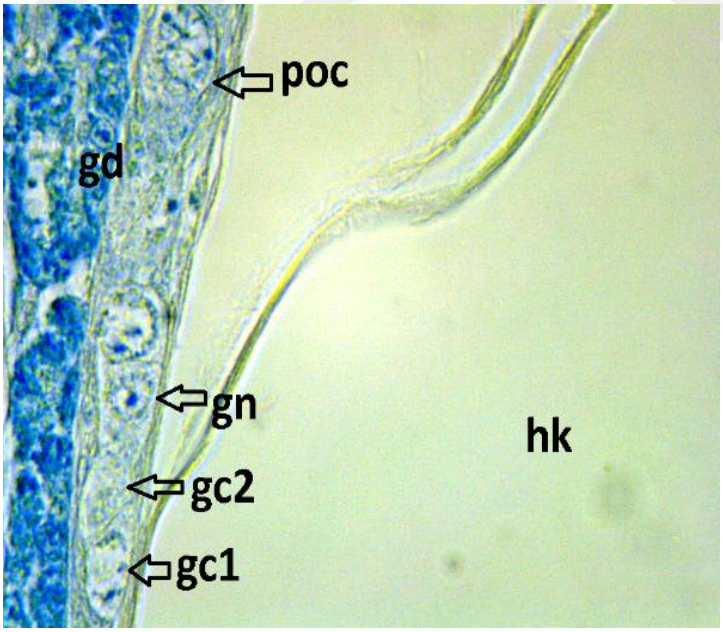
Şekil 4.131. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, poc: perinükleolar oosit, Toluidin mavisi ve Best Carmin boyama, a-x40, b-x100,.

0.25 mg/L LAS uygulaması yapılan grupta gelişimin 57. gününde, ince barsakta primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Kontrol grubuna kıyasla 0,25 mg/L LAS uygulaması sonucunda cinsiyet oluşumunun gerçekleşmediği görüldü. Gonadlarda

goniyal hücrelere ve birkaç perinükleolar oosite rastlandı (Şekil 4.132. ve Şekil 4.133.).



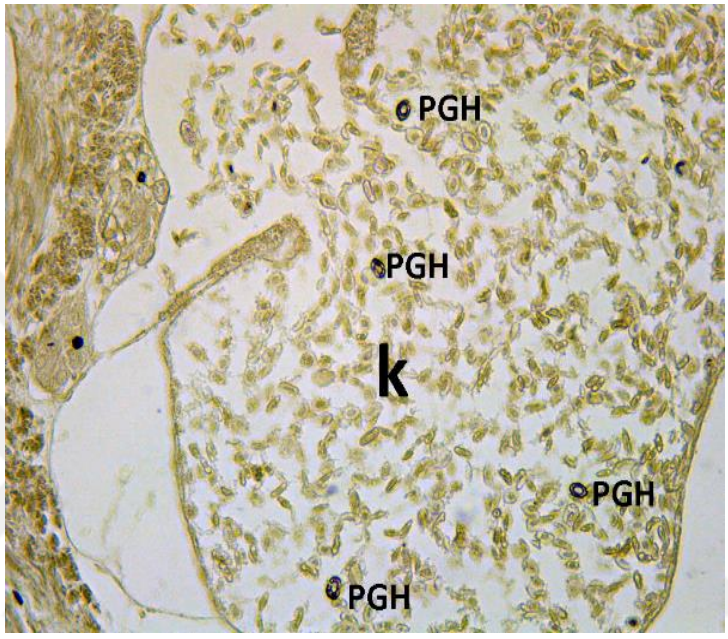
Şekil 4.132. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, hk: hava kesesi, gd: gonad, poc: perinükleolar oosit, Toluidin mavisi boyama, x100.



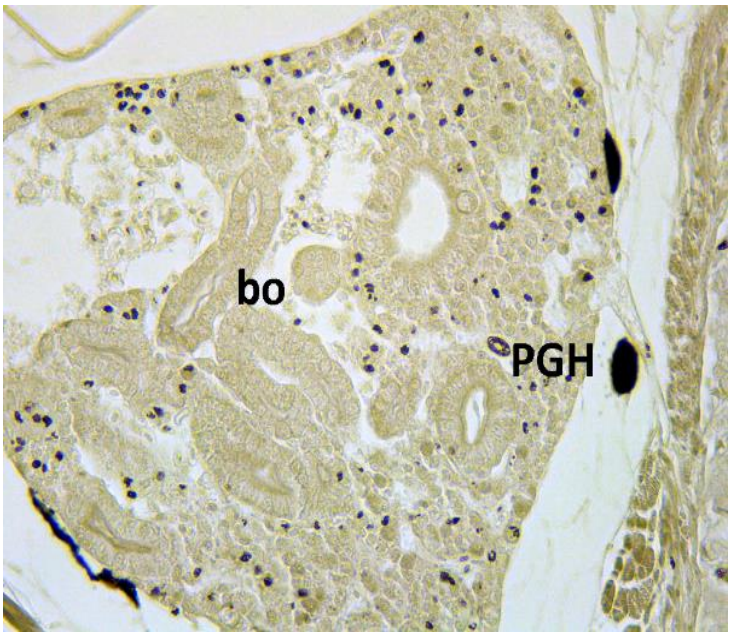
Şekil 4.133. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, poc: perinükleolar oosit, Toluidin mavisi boyama, x100.

0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 60. gününde, solungaçta, kalpte (Şekil 4.134.), karaciğerde, ince barsakta ve gonadal bölgede primordiyal germ

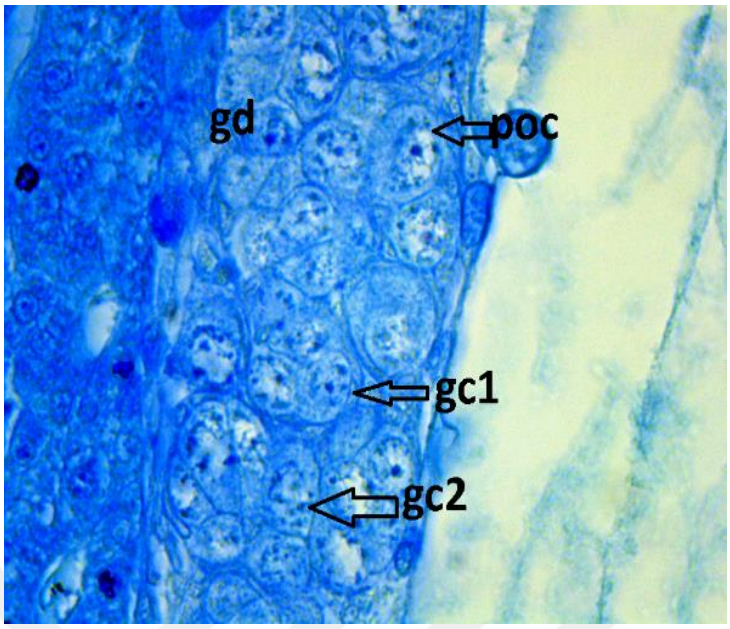
hücreleri gözlendi. Böbrekte (Şekil 4.135.) ve beyinde göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısında goniyal hücrelerin ve perinükleolar oositlerin yanı sıra tip1 ve tip 2 germ hücreleri görüntülendi (Şekil 4.136.). Dejenere olmuş oositler tespit edildi. Kontrol grubuna kıyasla testis ya da ovaryum yönünde bir farklılaşma meydana gelmediği görüldü. (Şekil 4.137.).



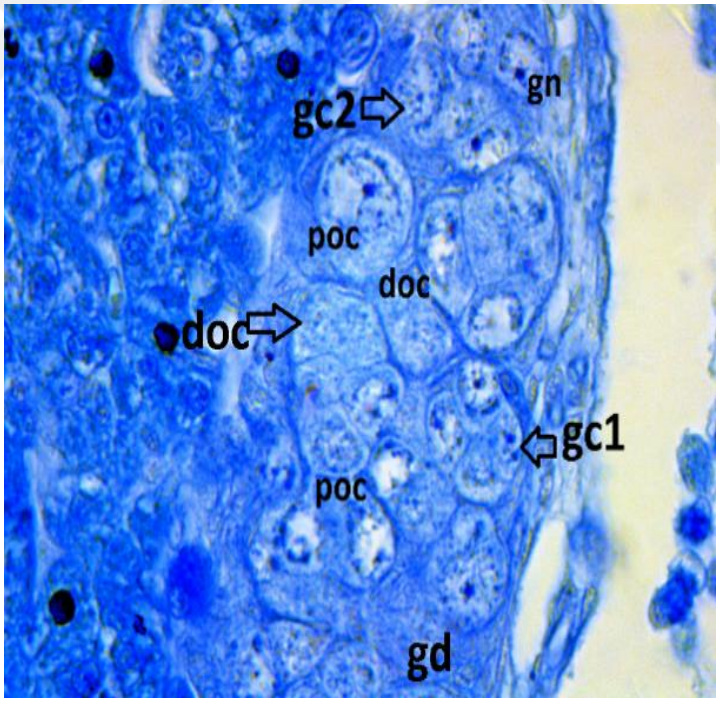
Şekil 4.134. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama x40.



Şekil 4.135. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Alkalin Fosfataz boyama x40.



Şekil 4.136. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. gd: gonad, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, poc: perinükleolar oosit, Toluidin mavisi boyama, x100.

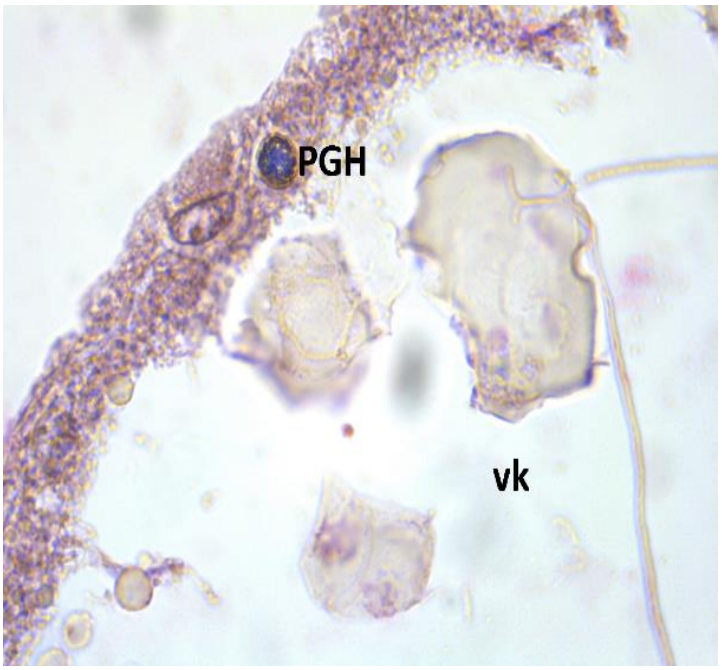


Şekil 4.137. 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, poc: perinükleolar oosit, gn: goniyal hücre, doc: dejenere oosit, Toluidin mavisi boyama, x100.

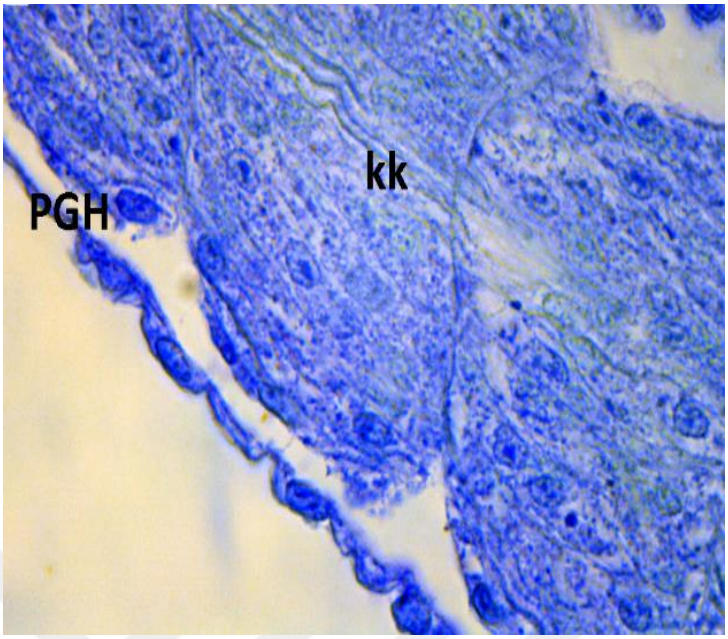
4.6.3. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde, özofagusta, ince barsakta ve gonadal bölgede primordiyal germ hücrelerine rastlanmıştır. Göz, böbrek, beyin, kuyruk gibi bölgelerde 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücreleri tespit edilmiştir. İncelenen histolojik kesitlerde, 0,25 mg/L LAS uygulaması yapılan grup ile karşılaştırıldığında daha fazla ektopik primordiyal germ hücresine rastlanmıştır. Gonad yapısı incelendiğinde, çok sayıda yapısı bozulmuş (dejenere olmuş) oosit ile karşılaşılmıştır.

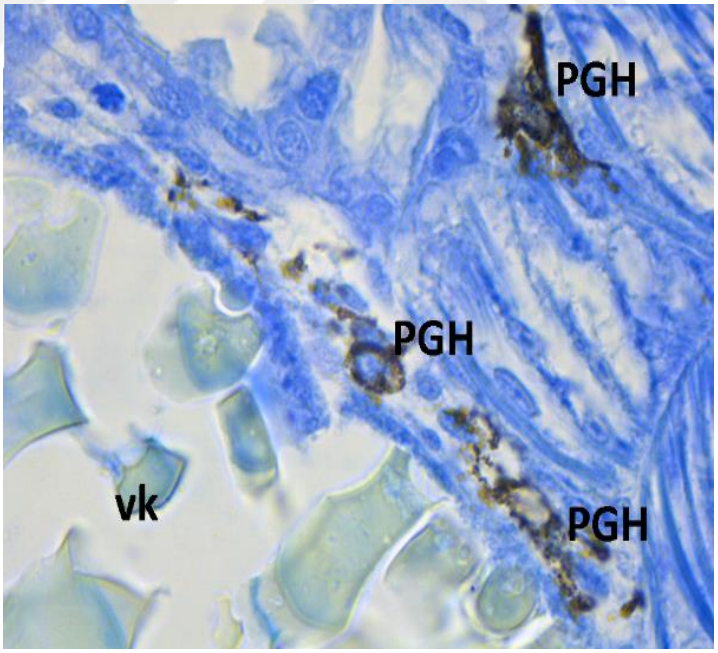
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 1. gününde, vitellüs kesesinin dorsal kısmında yuvarlak şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi (Şekil 4.138.). 0,25 mg/L'lik grupta olduğu gibi bu grupta da ektopik bölgelerde primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Kuyrukta göç yolundan sapmış, somatik hücrelere göre daha büyük boyutlu, iğ şeklinde primordiyal germ hücreleri gözlendi (Şekil 4.139.). 2. günde ise, vitellüs kesesinin dorsalinde (Şekil 4.140.) ve ventralinde (Şekil 4.141.), kuyrukta (Şekil 4.142.) ve göz kenarında (Şekil 4.143.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi.



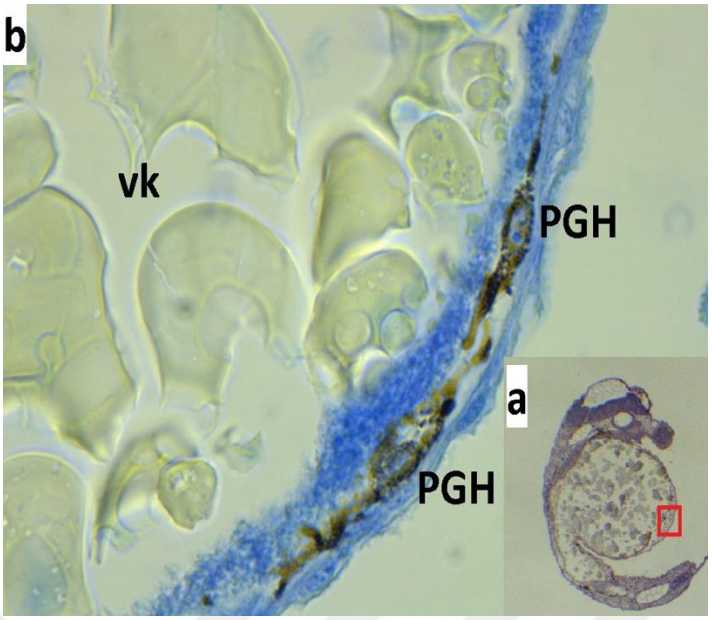
Şekil 4.138. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellüs kesesinin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi, Best Carmin boyama, x100.



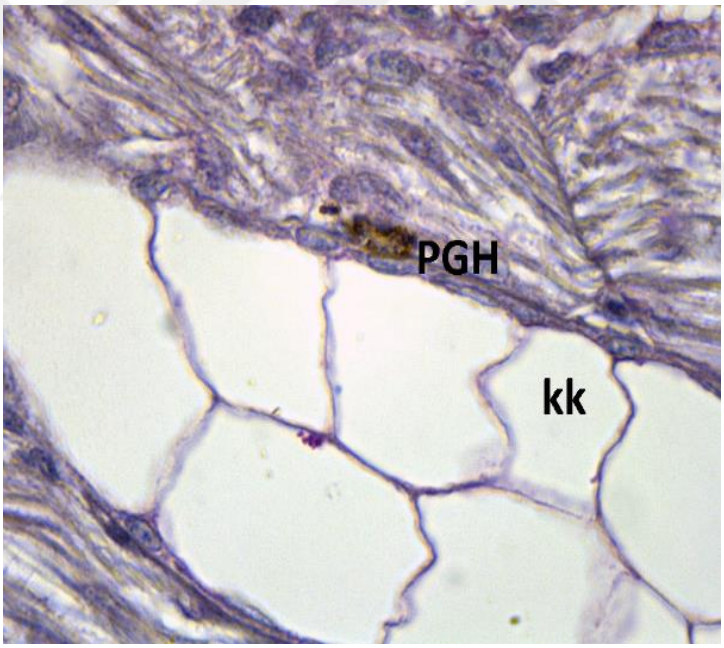
Şekil 4.139. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, Toluidin mavisi boyama, x100.



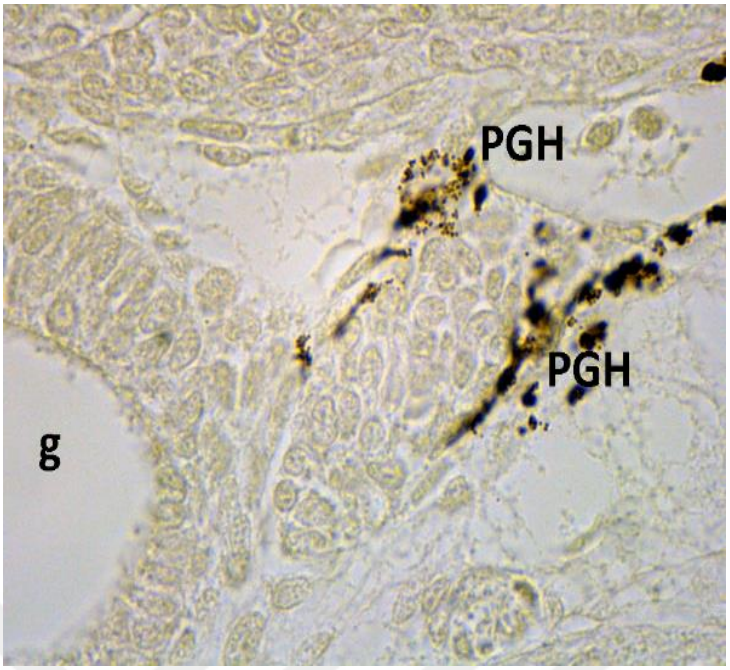
Şekil 4.140. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesinin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.141. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde vitellüs kesesinin ventralinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, Toluidin mavisi ve PAS boyama, a-x10, b-x100.

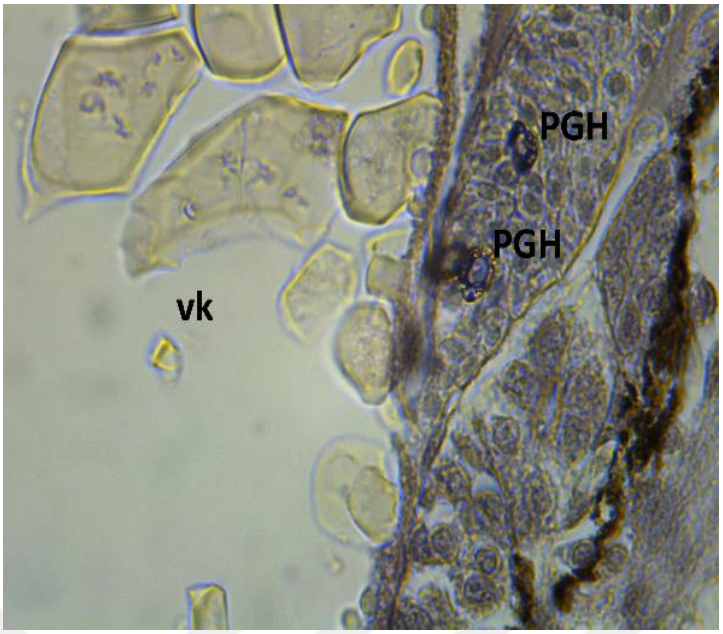


Şekil 4.142. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, PAS boyama, x100.

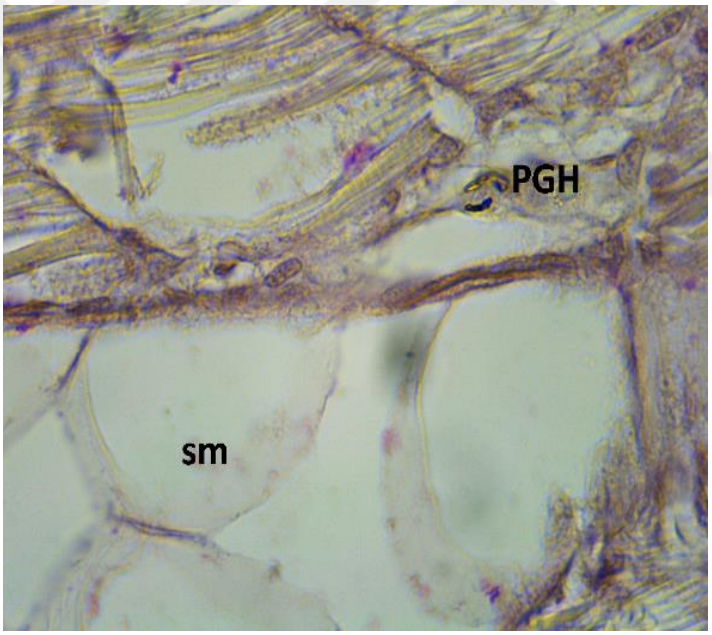


Şekil 4.143. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde göz kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri.. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 3. gününde, vitellüs kesesi dorsalinde (Şekil 4.144.) ve somitlerin kenarında (Şekil 4.145.) göç etmekte olan iğ şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Bu hücrelerin, sitoplazmalarında bol miktarda glikojen taneleri içerdikleri için Best Carmin ve PAS gibi boyalarla spesifik olarak boyandıkları görüldü.

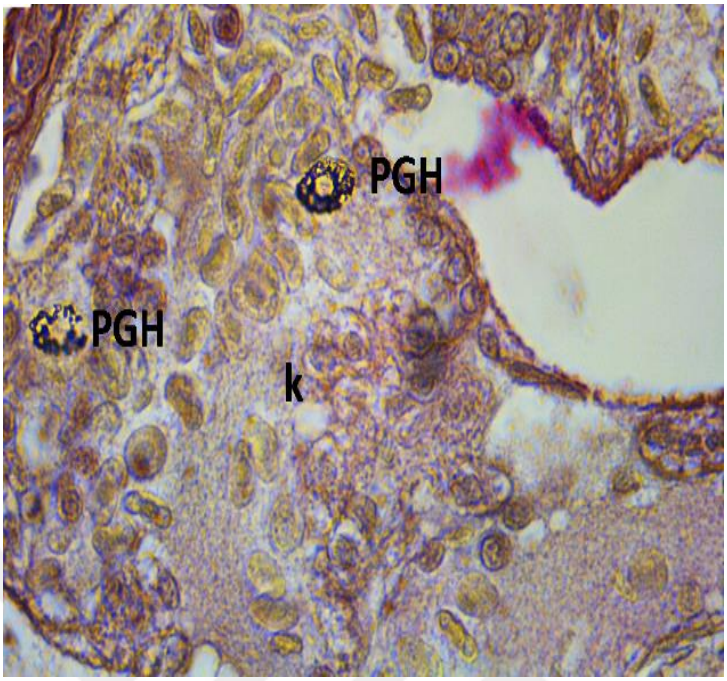


Şekil 4.144. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde vitellus kesesi dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellüs kesesi, PAS boyama, x100.

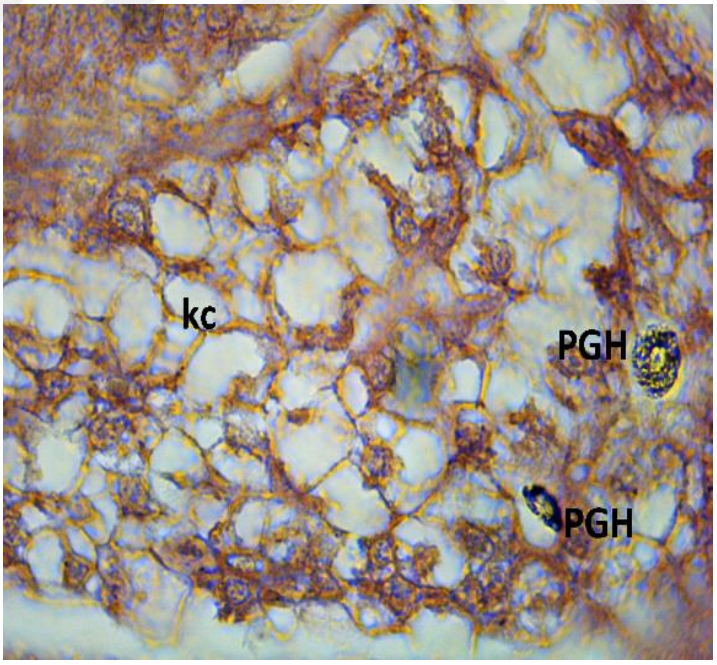


Şekil 4.145. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde somitlerin kenarında gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, sm: somit, Best carmin boyama, x100.

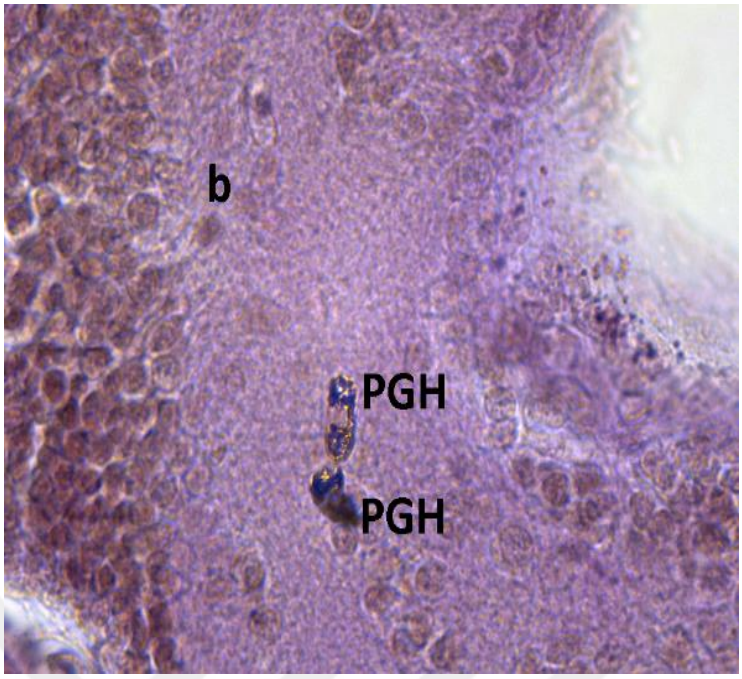
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 5. gününde, solungaçta, kalpte (Şekil 4.146.), karaciğerde (Şekil 4.147.) ve ince barsakta primordiyal germ hücreleri, büyük çekirdekleri ve sitoplazmalarında içerdikleri granüller sayesinde kolayca teşhis edildi. Beyinde (Şekil 4.148.) ve somitlerin kenarında (Şekil 4.149.) göç yolundan sapmış primordiyal germ hücrelerinin varlığı görüntülendi.



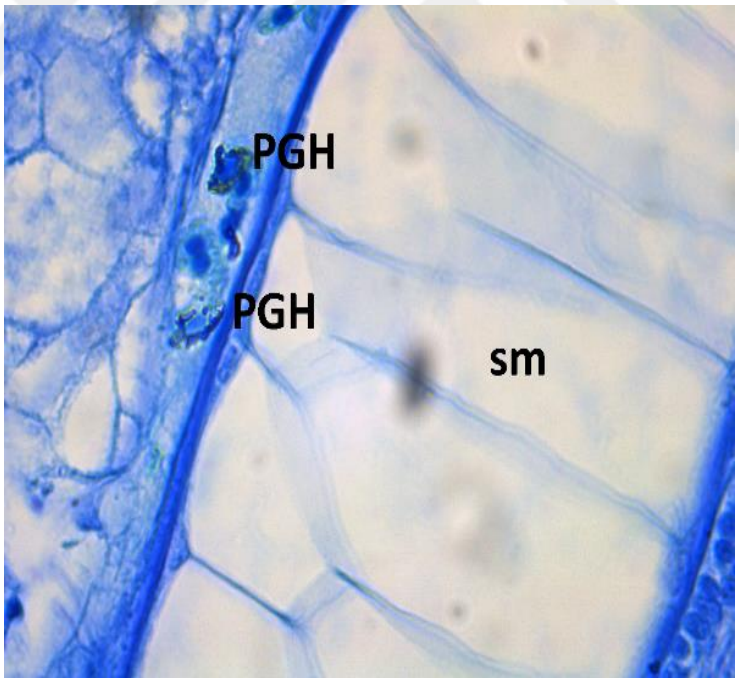
Şekil 4.146. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Best carmin boyama, x100.



Şekil 4.147. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, kc: karaciğer, Best Carmin boyama, x100.



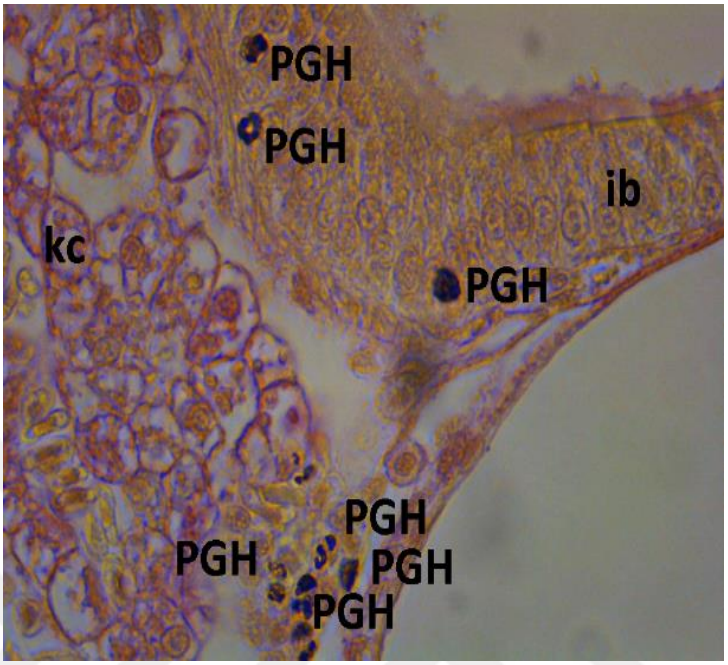
Şekil 4.148. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücreleri, b: beyin, PAS boyama, x100.



Şekil 4.149. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde somitlerin kenarında gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, sm: somit, Toluidin mavisi, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 7. gününde, alınan kesitlerde karaciğerde ve ince barsakta yuvarlak şekilli, büyük nükleuslu primordiyal germ

hücreleri tespit edildi (Şekil 4.150.). Ektopik olarak beyin dokusunda göç yolundan sapmış primordiyal germ hücrelerine rastlandı (Şekil 4.151.).

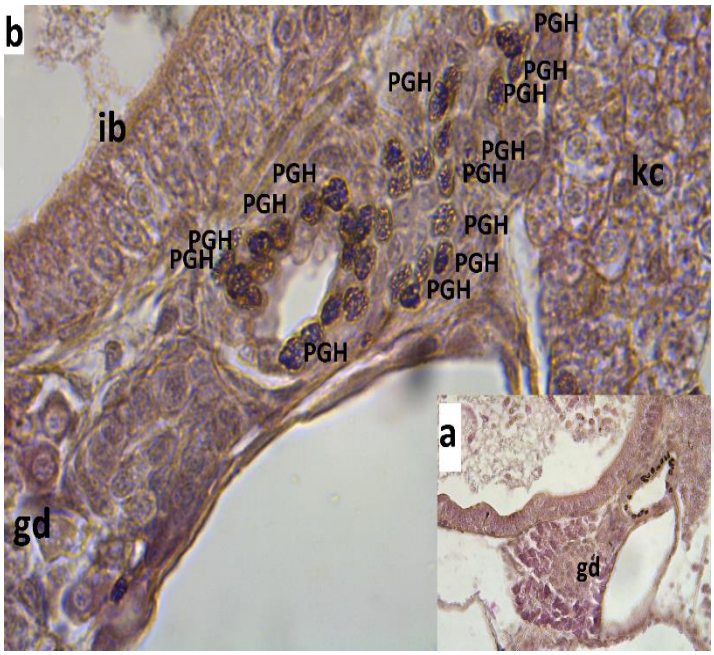


Şekil 4.150. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde karaciğer ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Best Carmin boyama,x100.

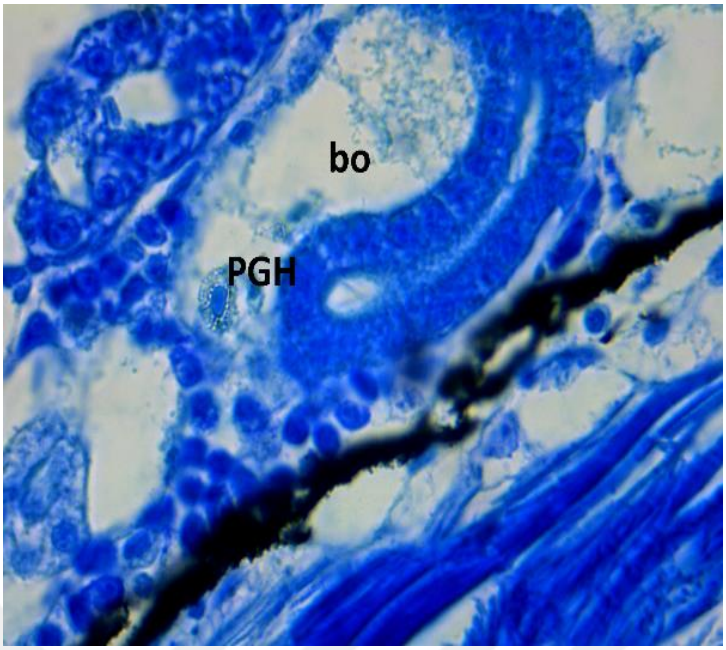


Şekil 4.151. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, PAS boyama, x40.

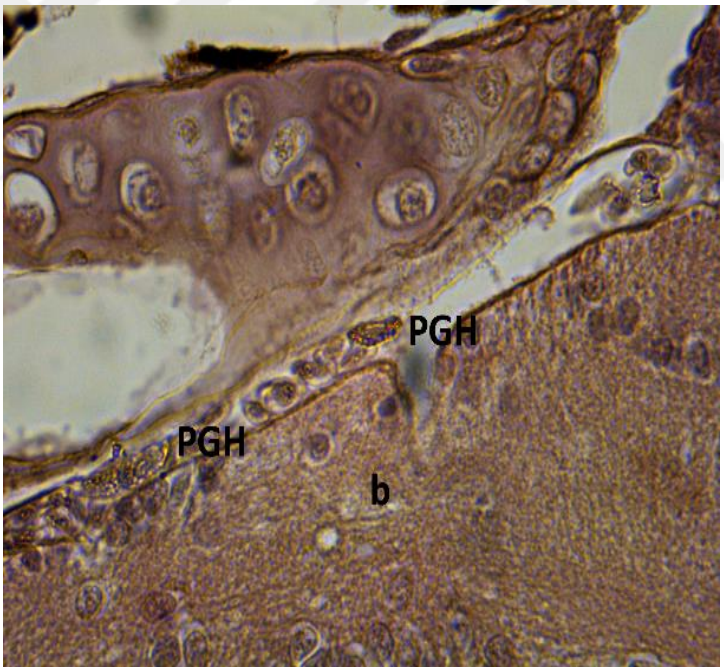
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 10. gününde, solungaçta, kalpte, özofagusta, ince barsakta, hava kesesi ile somitlerin arasındaki bölgede ve gonad taslakları yakınında (Şekil 4.152.) göç etmekte olan iğ şekilli primordiyal germ hücreleri görüntülendi. 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucu böbrekte (Şekil 4.153.) ve beyinde (Şekil 4.154.) göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 12. günde ise kalp (Şekil 4.155.) ve karaciğerde görülen primordiyal germ hücrelerin yanı sıra beyinde (Şekil 4.156.) ve kas tabakasında farklı yöne göç eden ektopik primordiyal germ hücrelerine rastlandı.



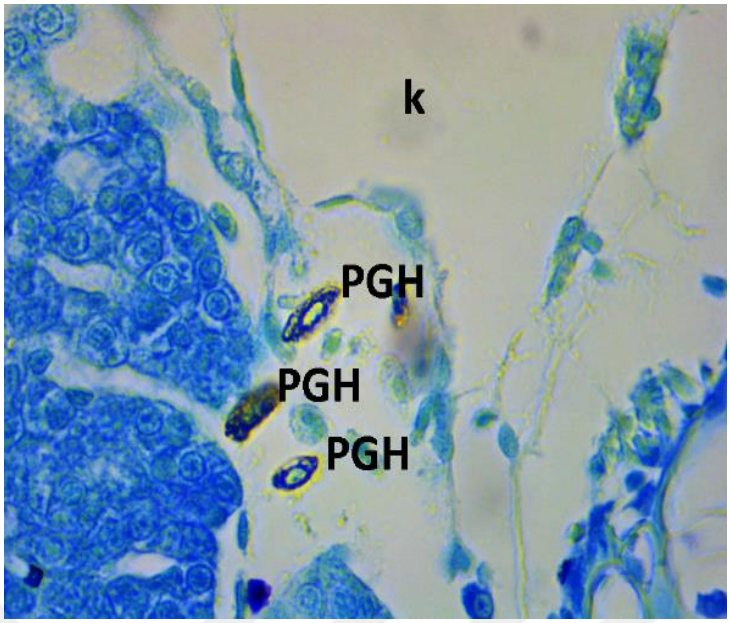
Şekil 4.152. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, gd: gonad, kc: karaciğer, Best Carmin boyama, a- x40, b-x100.



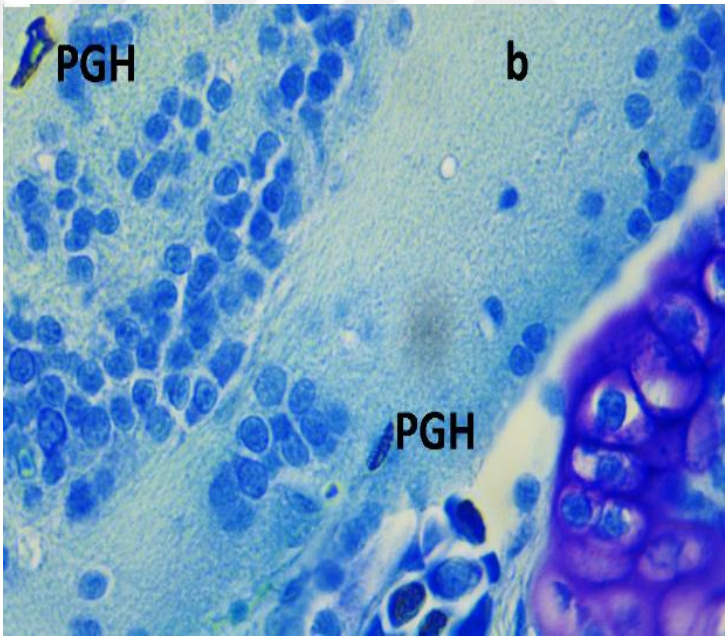
Şekil 4.153. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.154. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, x100.



Şekil 4.155. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.

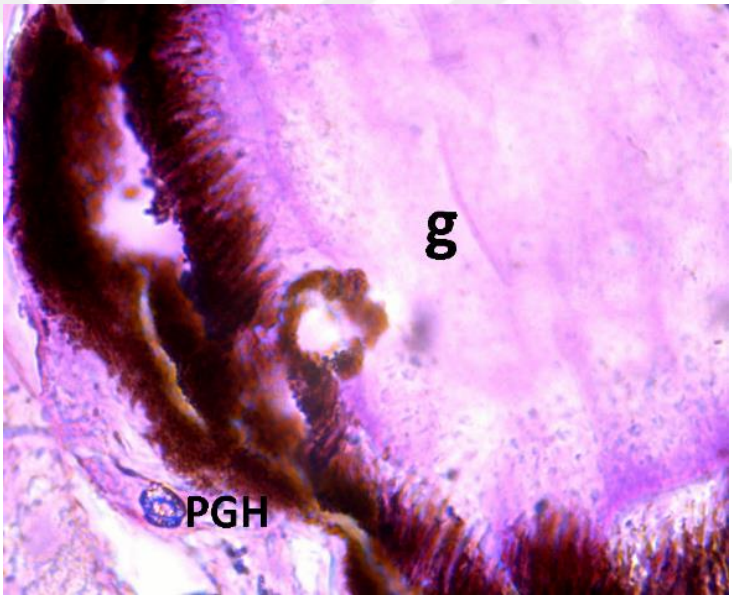


Şekil 4.156. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Toluidin mavisi boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 13. gününde, solungaçlarda, kalpte, karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.157.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Ektopik olarak gözde primordiyal germ hücreleri gözlendi (Şekil 4.158.).



Şekil 4.157. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Alkalin fosfataz boyama, x100

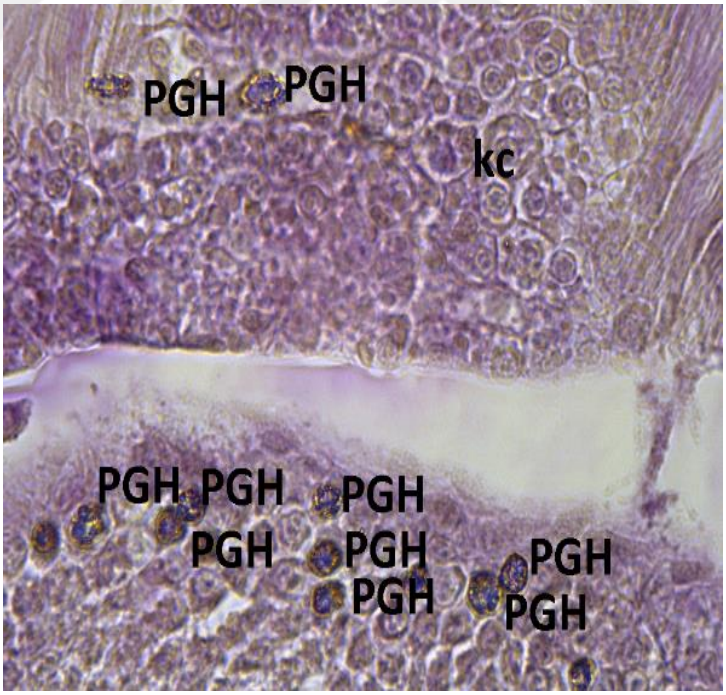


Şekil 4.158. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x100.

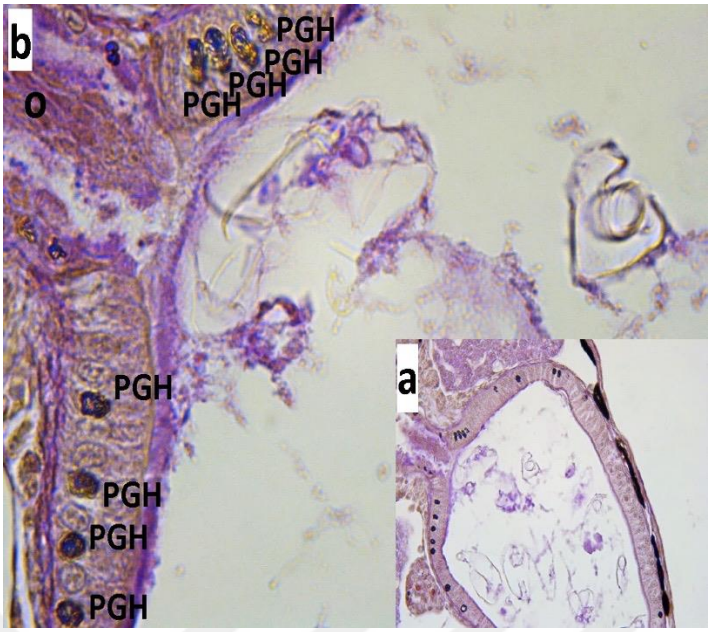
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 16. gününde, solungaçta (Şekil 4.159.), karaciğerde (Şekil 4.160.), özofagus (Şekil 4.161.)ve ince barsakta gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri gözlendi. Ektopik olarak kas tabakasında göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri görüntülendi (Şekil 4.162.).



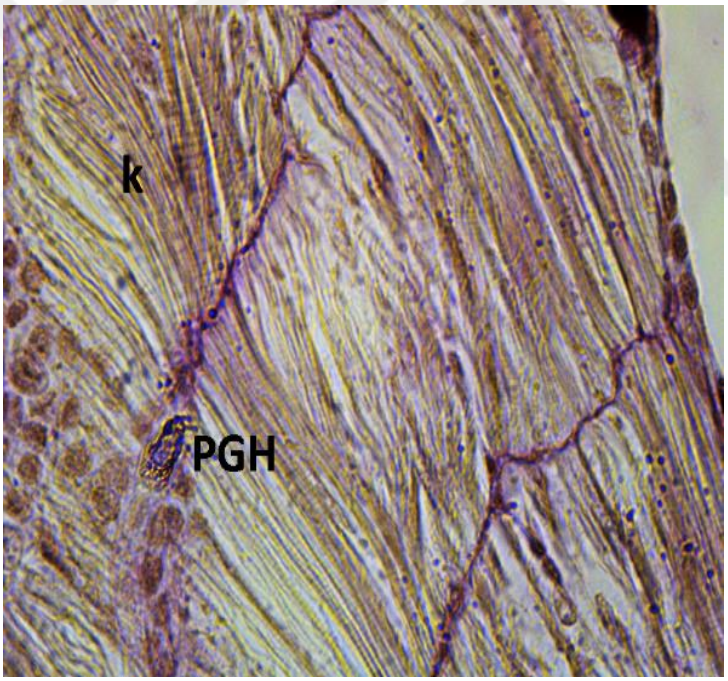
Şekil 4.159. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Best Carmin boyama, x100.



Şekil 4.160. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, PAS boyama, x100.



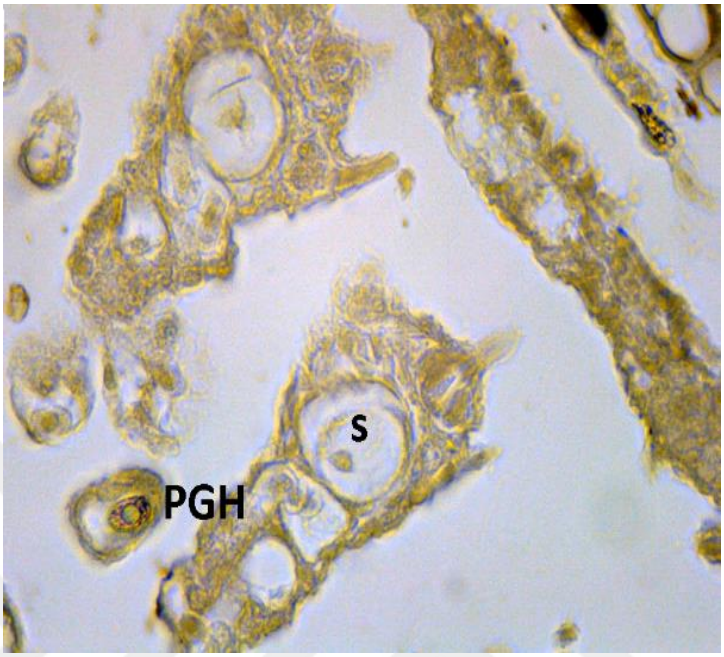
Şekil 4.161. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde özofagus ve ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama, a-x40, b-x100.



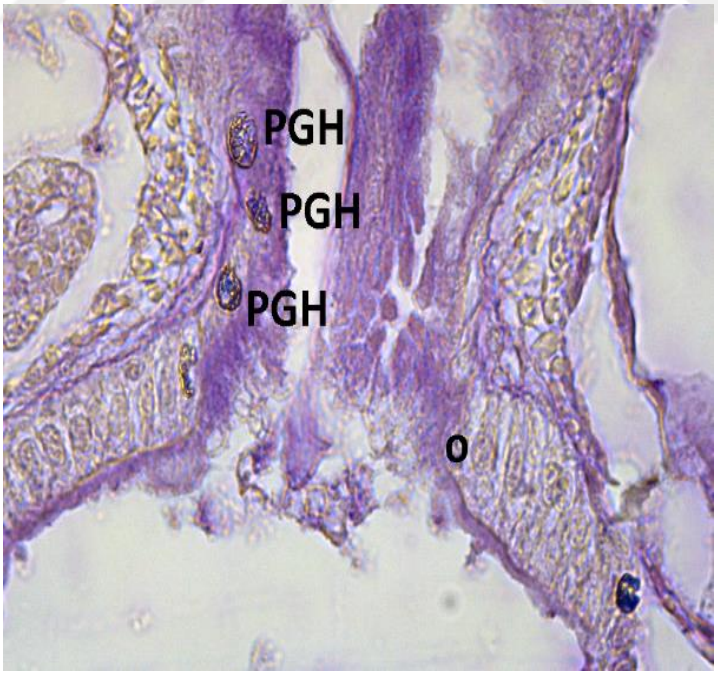
Şekil 4.162. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kas tabakasında görülen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k kas tabakası a- PAS boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 17. gününde, solungaçta (Şekil 4.163.), kalpte, özofagusta (Şekil 4.164.), ince barsakta primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Ektopik olarak beyinde ve böbrekte (Şekil 4.165.) primordiyal germ

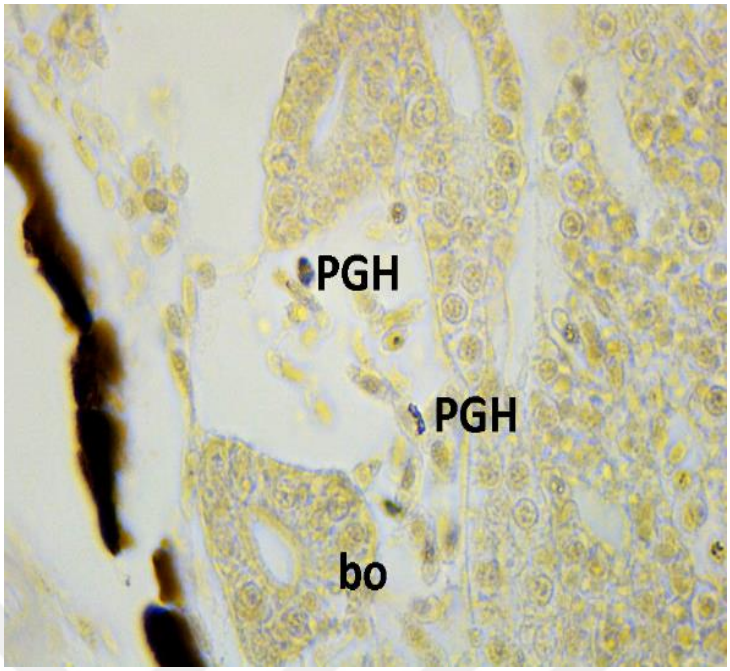
hücreleri tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde primordiyal germ hücrelerinin goniyal hücrelere farklılaştığı görüldü (Şekil 4.166.).



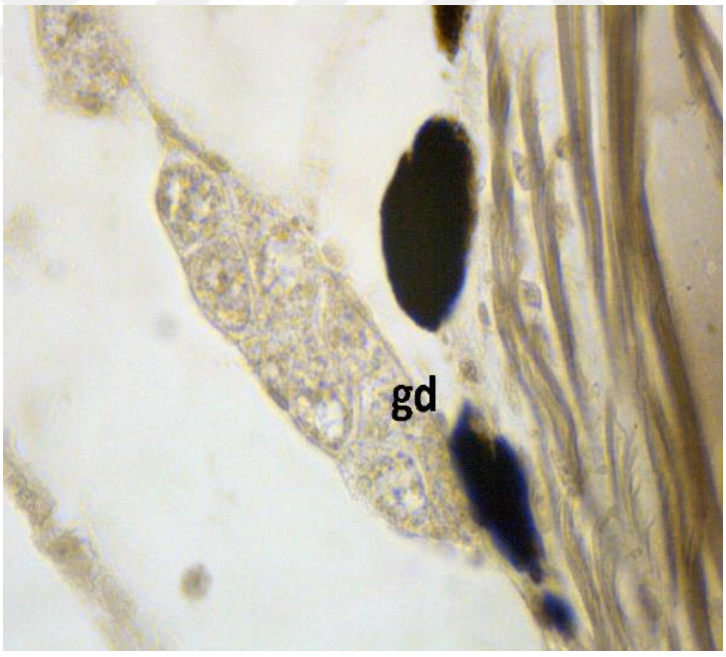
Şekil 4.163. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Alkalin fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.164. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, PAS boyama, x100.



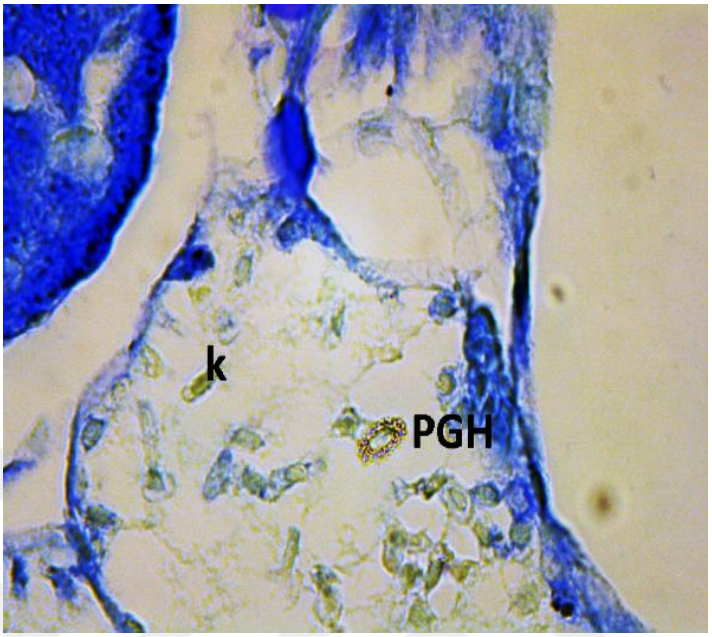
Şekil 4.165. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Alkalin fosfataz boyama, x100.



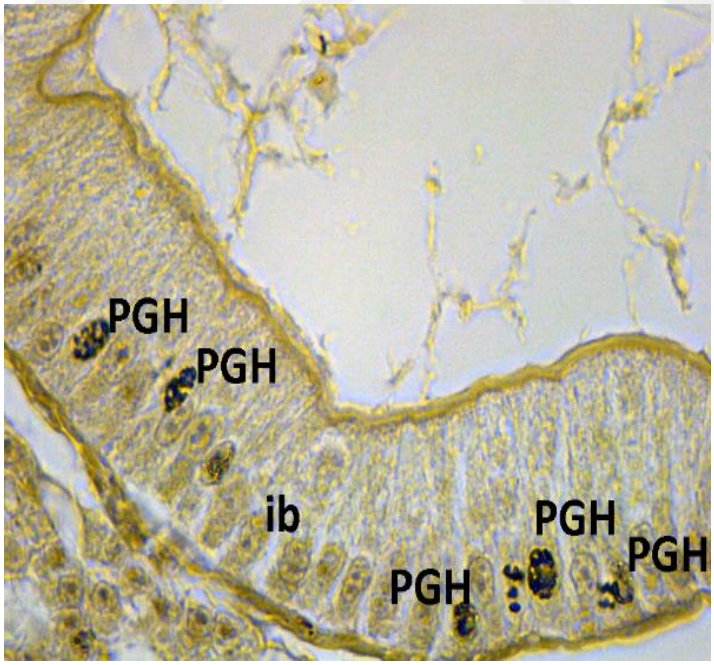
Şekil 4.166. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde gonad taslağında görülen goniyal hücreler, gd: gonad, Alkalin fosfataz boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 19. gününde, kalpte (Şekil 4.167.), özofagusta ve ince barsakta (Şekil 4.168.) gonadal bölgeye doğru göç etmekte olan iğ şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Göç yolundan sapmış olan primordiyal germ hücrelerine kuyrukta (Şekil 4.169.) ve beyinde rastlandı. Gonad

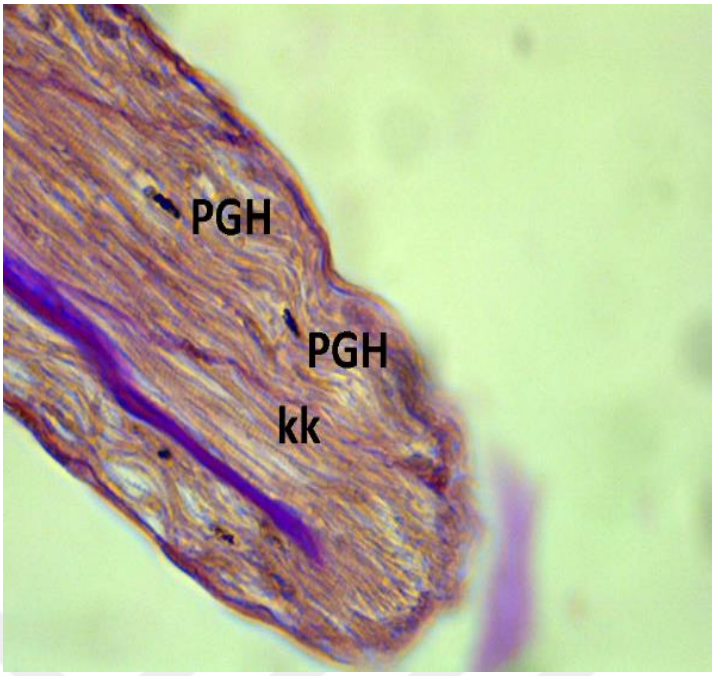
yapısı incelendiğinde mitotik ve mayotik bölünmelerin başladığı görüldü. Goniyal hücrelerin yanı sıra, tip 1 ve tip 2 germ hücreleri görüntülendi (Şekil 4.170.).



Şekil 4.167. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kalpte görülen primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.168. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri, ib: ince barsak, Alkalin fosfataz boyama, x100.



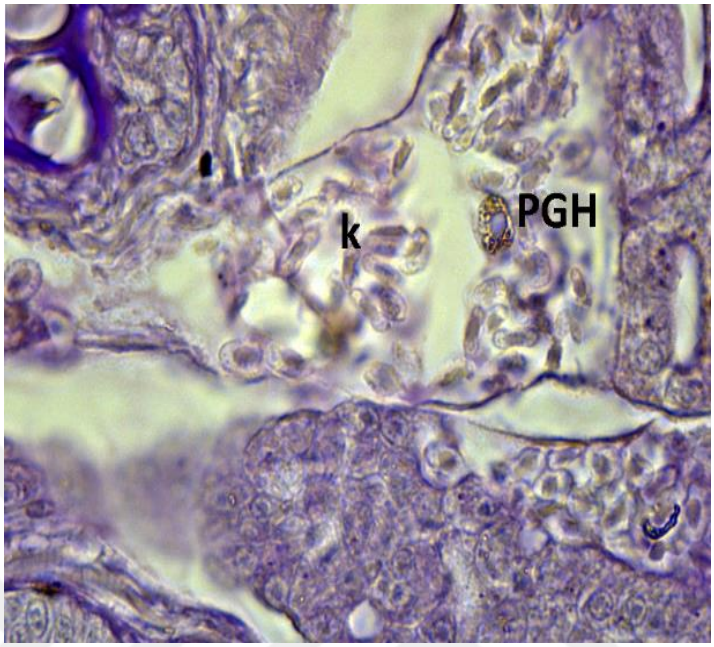
Şekil 4.169. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde kuyrukta görülen primordiyal germ hücreleri, kk: kuyruk, PAS boyama, x100.



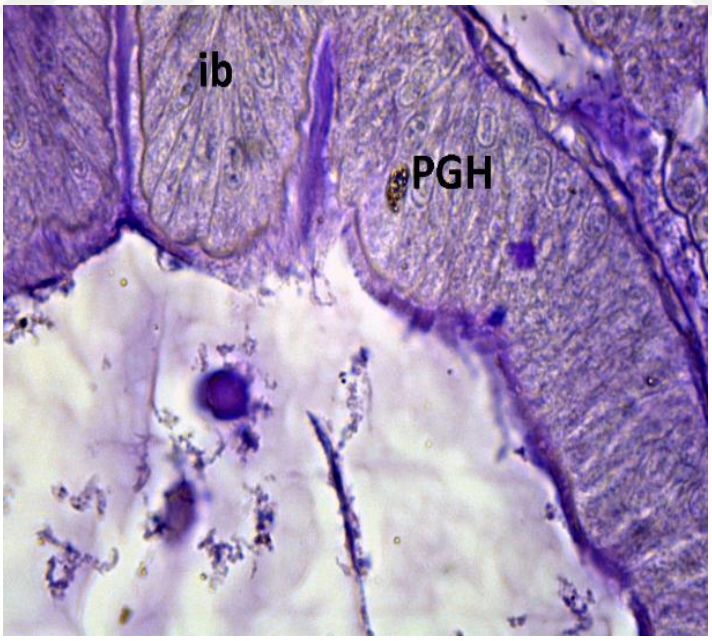
Şekil 4.170. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, Alkalin Fosfataz, boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 25. gününde ise, solungaç lamellerinde, kalpte (Şekil 4.171.) ve ince barsakta (Şekil 4.172.) iğ şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Ektopik olarak, kuyrukta (Şekil 4.173.) ve beyinde

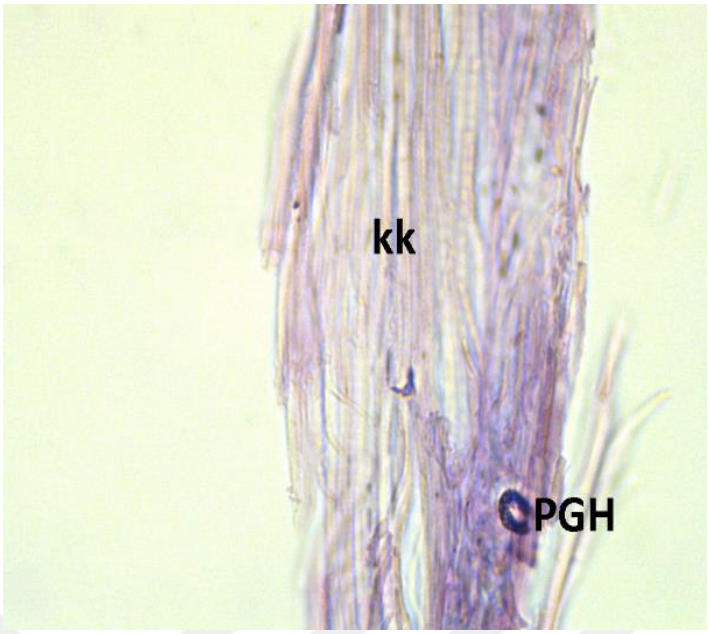
primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Gonad yapısı incelendiğinde, 19. günde olduğu gibi, goniyal hücreler, tip 1 ve tip 2 hücreleri görüntülendi (Şekil 4.174.).



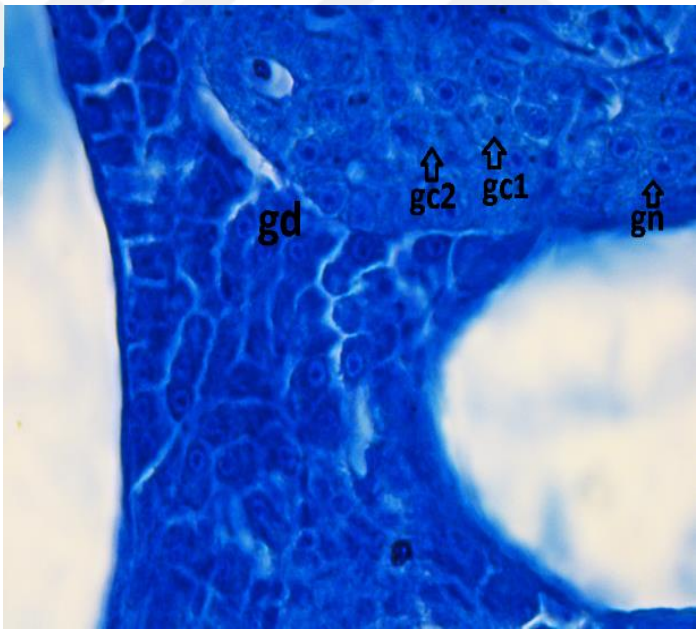
Şekil 4.171. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, PAS boyama, x100



Şekil 4.172. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x40

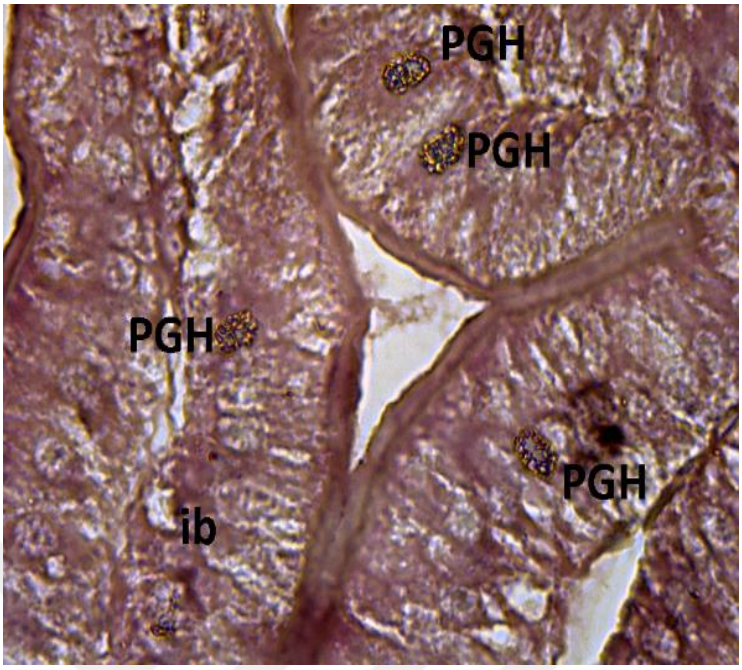


Şekil 4.173. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi, PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, PAS boyama, x100

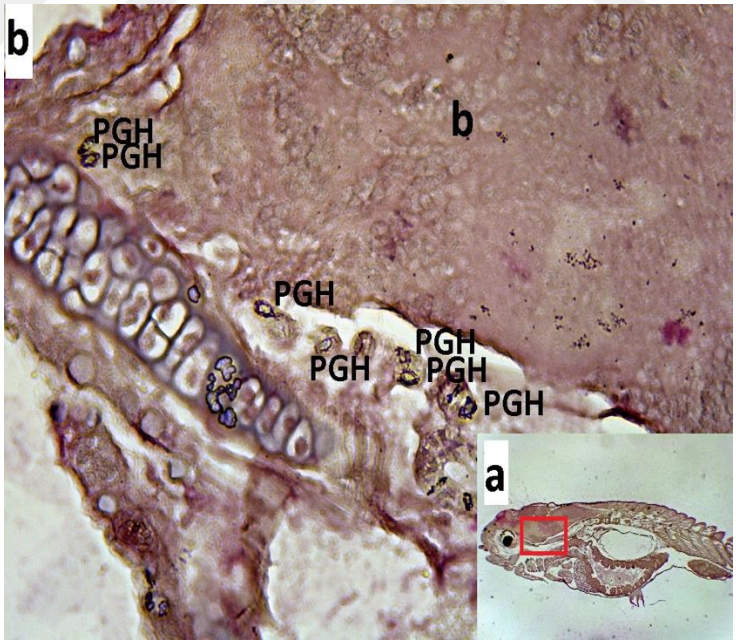


Şekil 4.174. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı. gd: gonad,gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, gn: goniyal hücre, Toluidin mavisi boyama, x40.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 29. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, özofagusta, karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.175.) göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri görüldü. Alt ve üst çenede, beyinde (Şekil 4.176.) ve kas tabakasında göç yolundan sapmış çok sayıda primordiyal germ hücreleri tespit edildi.



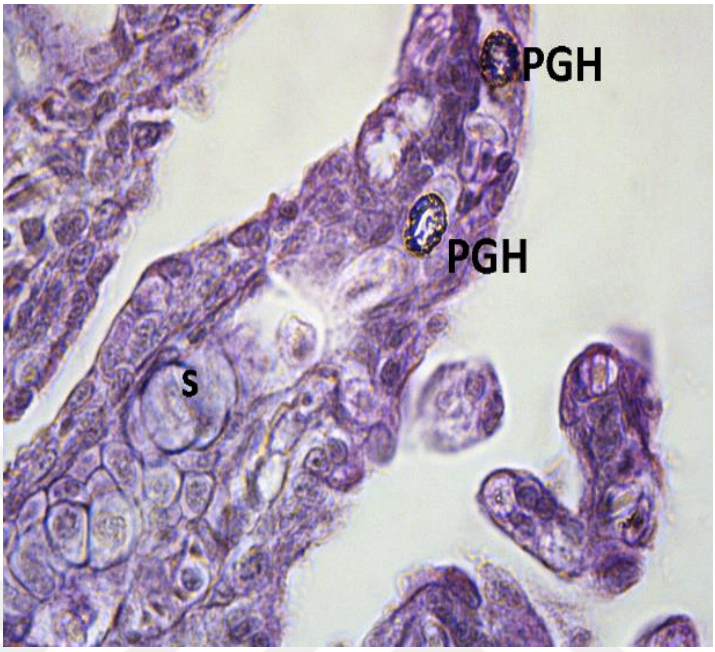
Şekil 4.175. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100



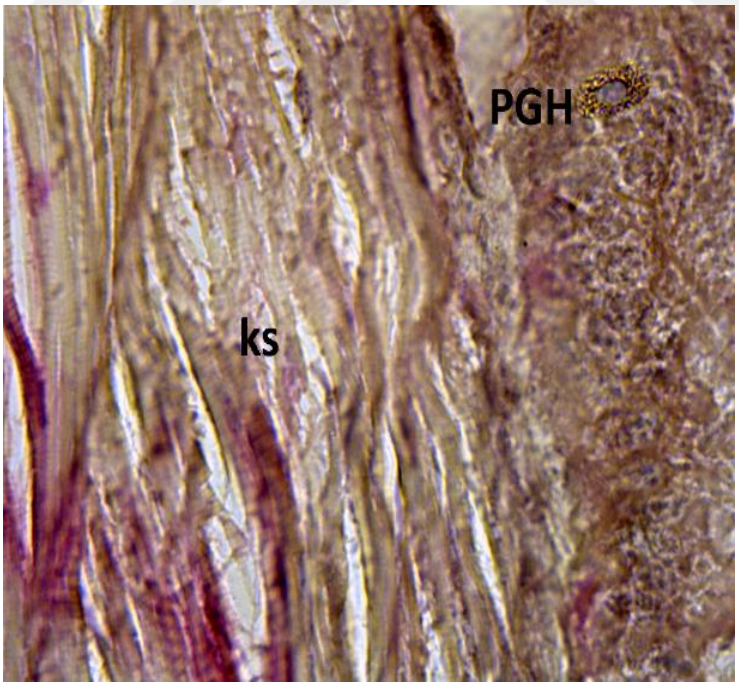
Şekil 4.176. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, a-x4, b-x40.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 33. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.177.), kalpte, karaciğerde, ince barsakta gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan, somitlerin dorsalinde ve ventralinde ve kas tabakasında (Şekil

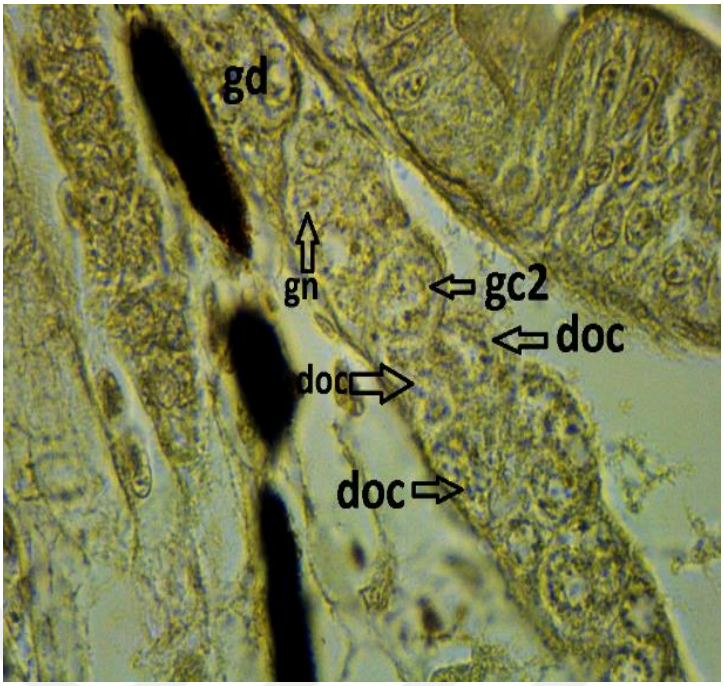
4.178.) ise ektopik primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısında goniyal hücrelerin yanı sıra dejenere olmuş oositler tespit edildi (Şekil 4.179.).



Şekil 4.177. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde solungaç lamellerinde gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, PAS boyama, x100.

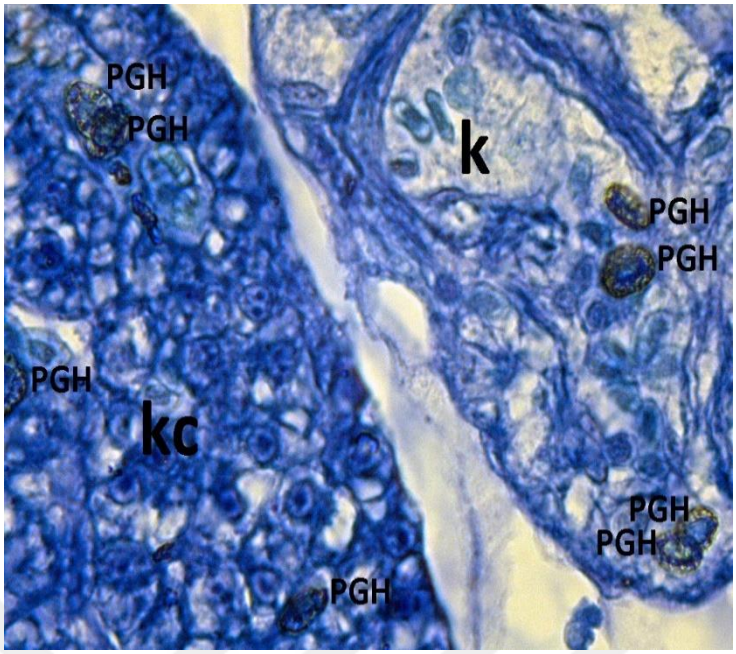


Şekil 4.178. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde kas tabakasında gözlenen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, ks: kas tabakası, Best Carmin boyama, x100.

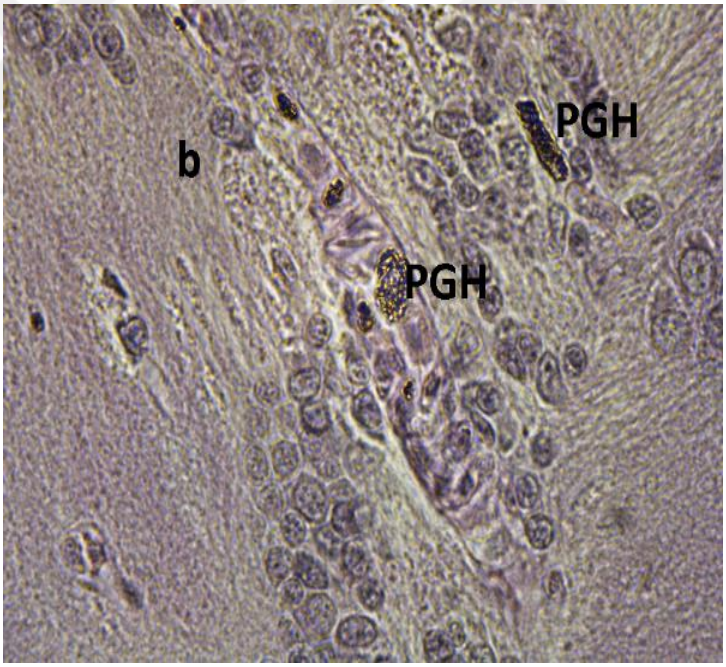


Şekil 4.179. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gonad yapısı. gd: gonad, doc: dejenere oosit, gc2: tip 2 germ hücresi, gn: goniyal hücre, Alkalin fosfataz boyama x100.

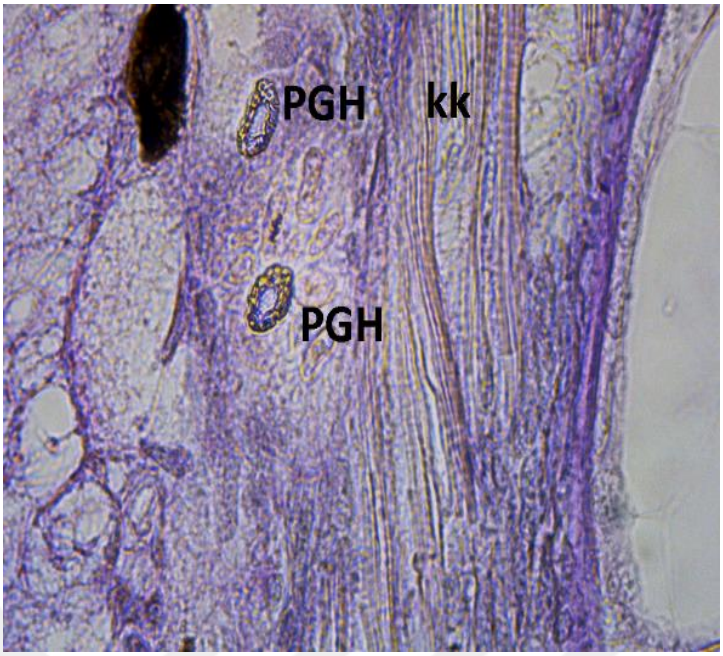
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 37. gününde, solungaçta, kalpte (Şekil 4.180.), özofagusta, karaciğerde, ince barsakta, gonad taslaklarında primordiyal germ hücreleri görüldü. 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan sapmış çok sayıda primordiyal germ hücreleri beyinde (Şekil 4.181.), gözde, kuyrukta (Şekil 4.182.) ve böbrekte tespit edildi.



Şekil 4.180. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kalp ve karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, kc: karaciğer, Toluidin mavisi boyama x100.

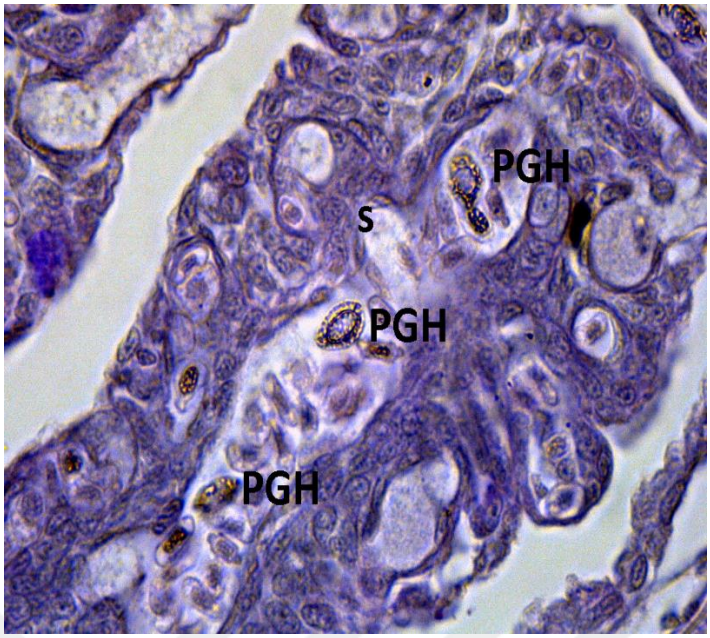


Şekil 4.181. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, PAS boyama x100.

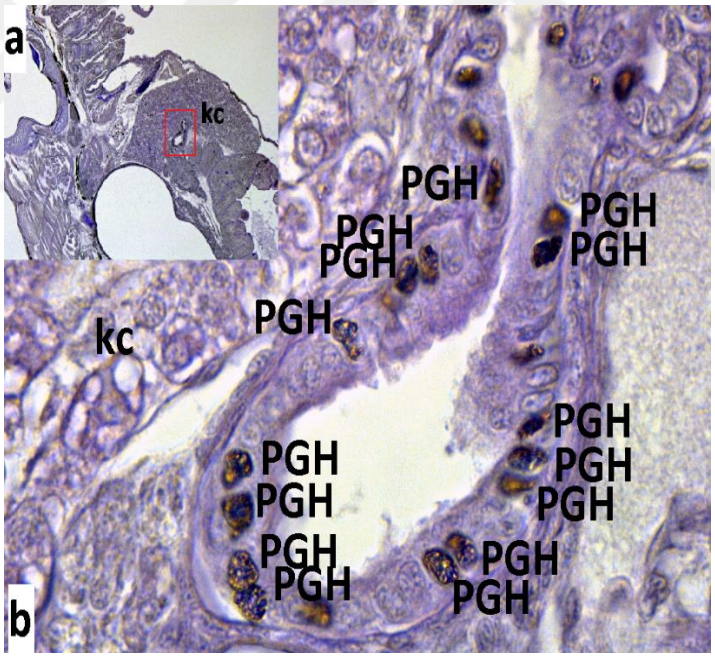


Şekil 4.182. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, PAS boyama, x100.

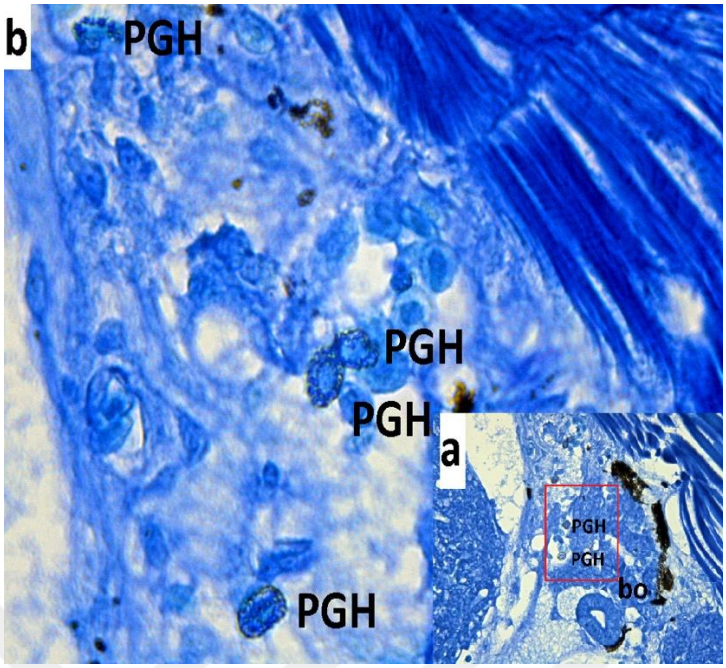
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 42. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.183.), kalpte, karaciğerde (Şekil 4.184.), özofagusta, ince barsakta ve gonadal bölgede primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Primordiyal germ hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan glikojen taneleri yapılan PAS boyamaları sayesinde net bir şekilde görüntülendi. 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan ayrılmış primordiyal germ hücreleri böbrekte görüldü (Şekil 4.185.). Gonad yapısı incelendiğinde, goniyal hücrelerin spermatogonyumlara farklılaştığı ve bu hücrelerin biraraya gelerek seminifer tübül benzeri yapı oluşturdukları tespit edildi. Tübülün orta kısmında lümen oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.186.).



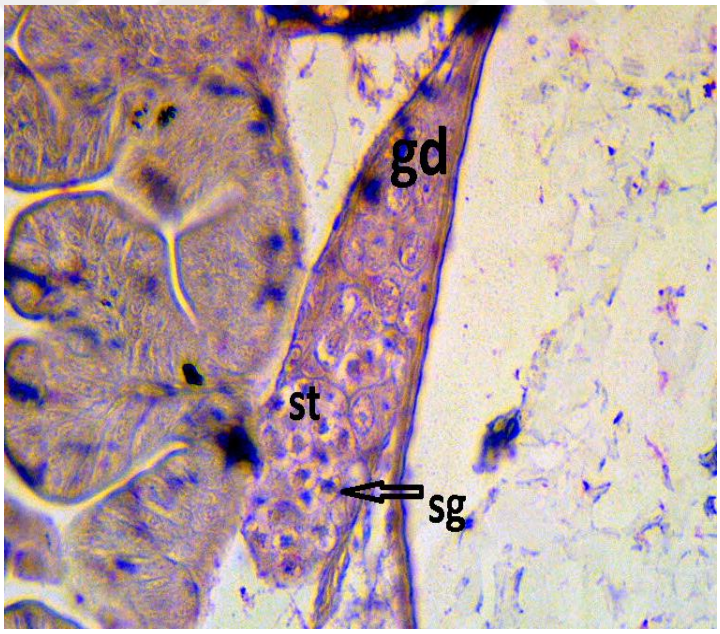
Şekil 4.183. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, PAS boyama, x100.



Şekil 4.184. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, PAS boyama, a-x10, b-x100.



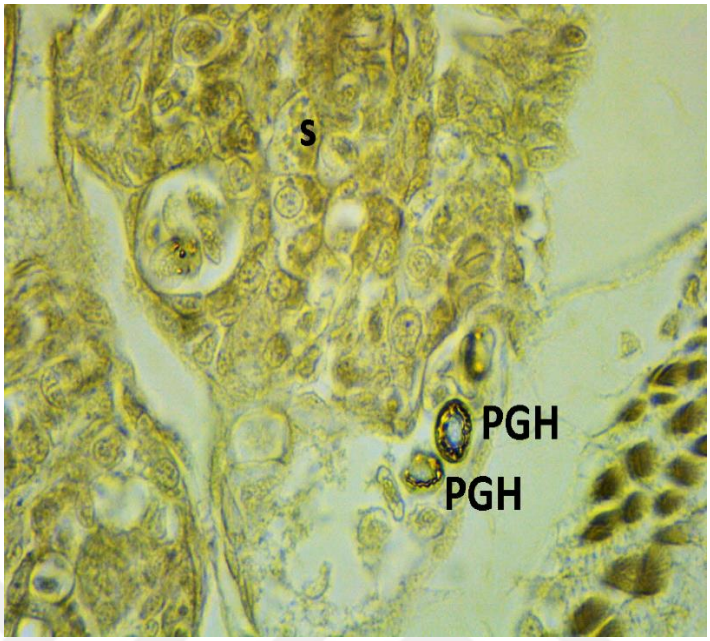
Şekil 4.185. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Toluidin mavisi boyama, a-40, b-x100.



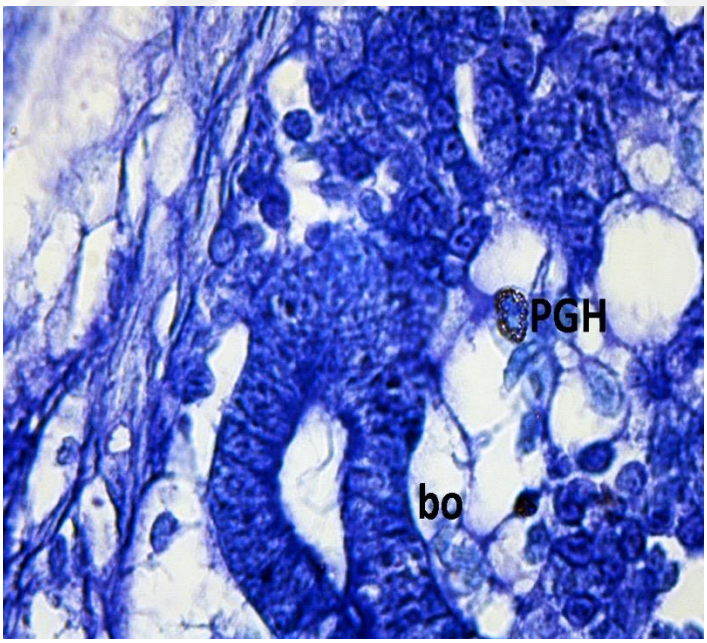
Şekil 4.186. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı. gd: gonad, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum, Best Carmin boyama, x40

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 47. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.187.), kalpte, özofagusta, ince barsakta iğ şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucunda göç yolundan ayrılan hücrelere böbrekte rastlandı (Şekil 4.188.). Gonad yapısı incelendiğinde,

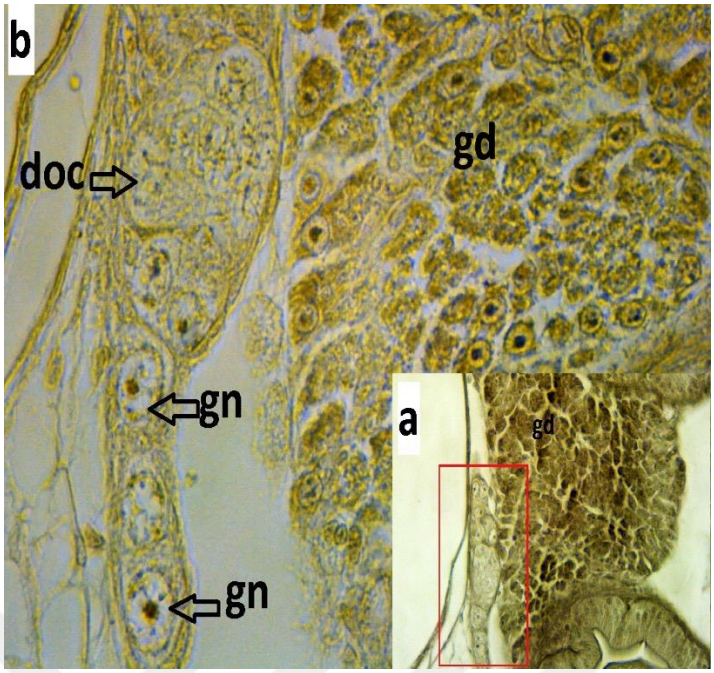
gonadın küçük bir kısmında gonadal farklılaşmanın başladığı görüldü (Şekil 4.189.). Goniyal hücreler, tip 1 ve tip 2 germ hücreleri ile dejenere oositler görüntülendi (Şekil 4.190.).



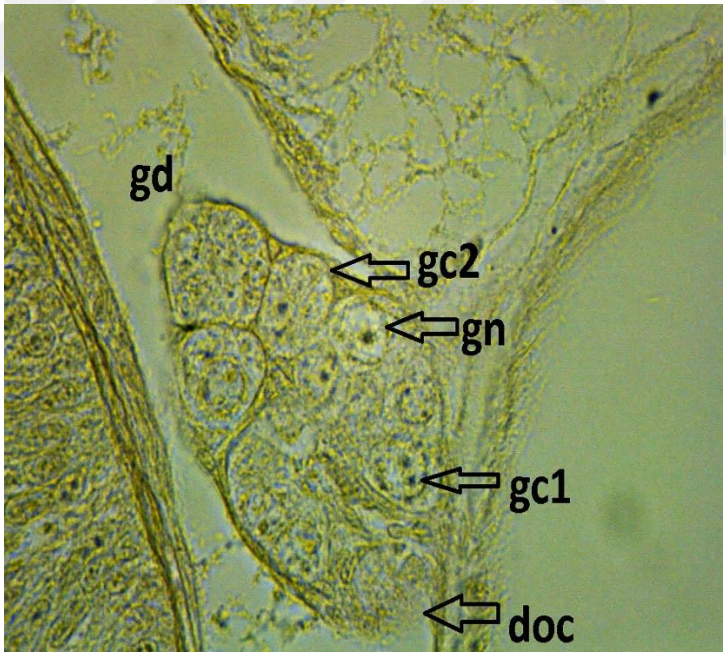
Şekil 4.187. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.188. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde böbrekte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Toluidin mavisi boyama, x100.



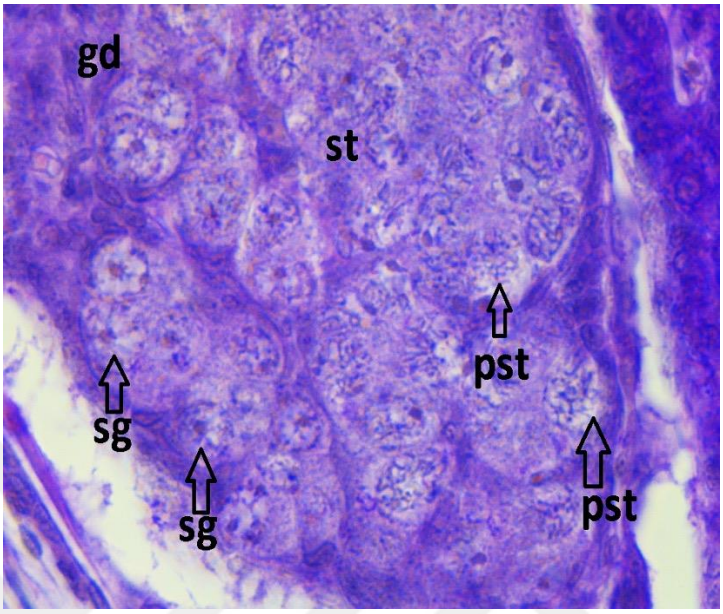
Şekil 4.189. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde görülen gonad yapısı, gd: gonad, gn: goniyal hücre, doc: dejenere oosit, Alkalin Fosfataz boyama, a-x40, b-x100.



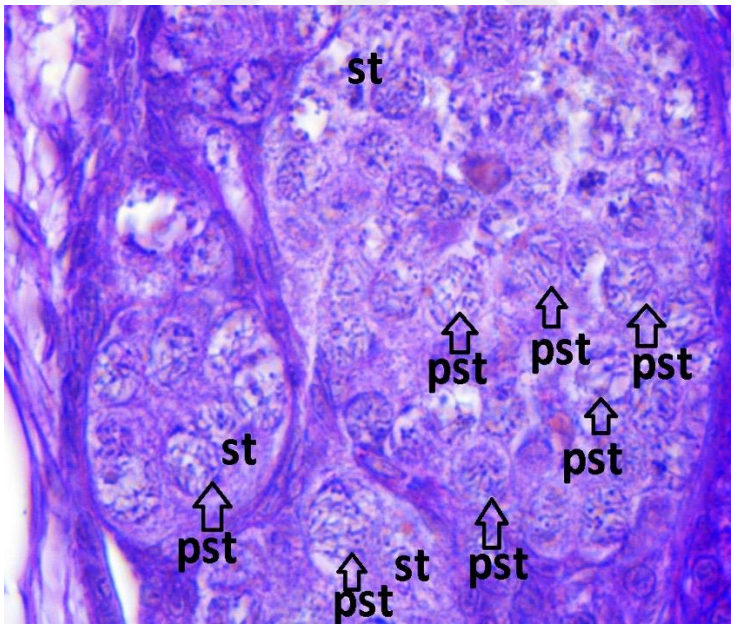
Şekil 4.190. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde görülen gonad yapısı, gd: gonad, gn: goniyal hücre, doc: dejenere oosit, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 52. gününde gonad yapısında testis yönünde farklılaşma izlendi. Spermatogonyumların primer spermatositlere farklılaştığı görüldü (Şekil 4.191.). Hücrelerde, mayoz bölünme evreleri net bir

biçimde görüntülendi. Seminifer tübüllerin ortasında lümen oluşumu gözlenmedi (Şekil 4.192.).



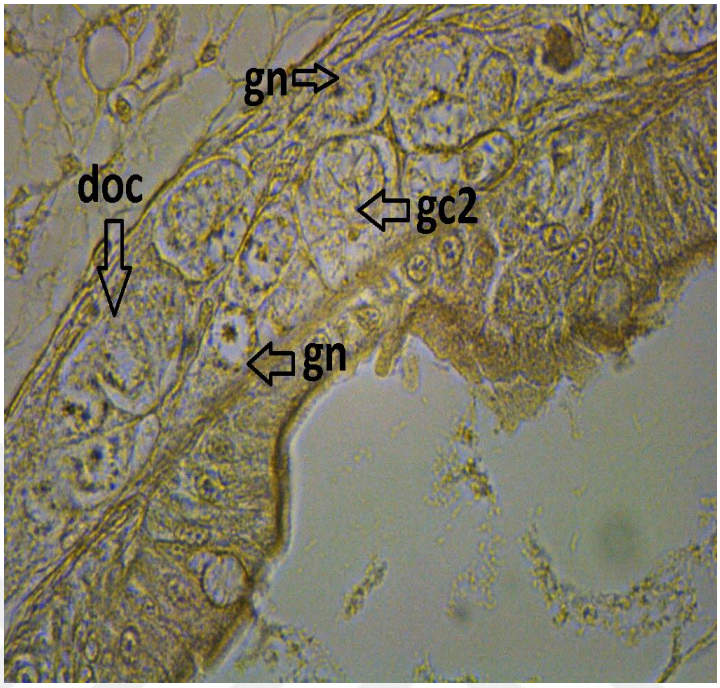
Şekil 4.191. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde görülen gonad yapısı, gd: gonad, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum, pst: primer spermatosit, PAS boyama, x100.



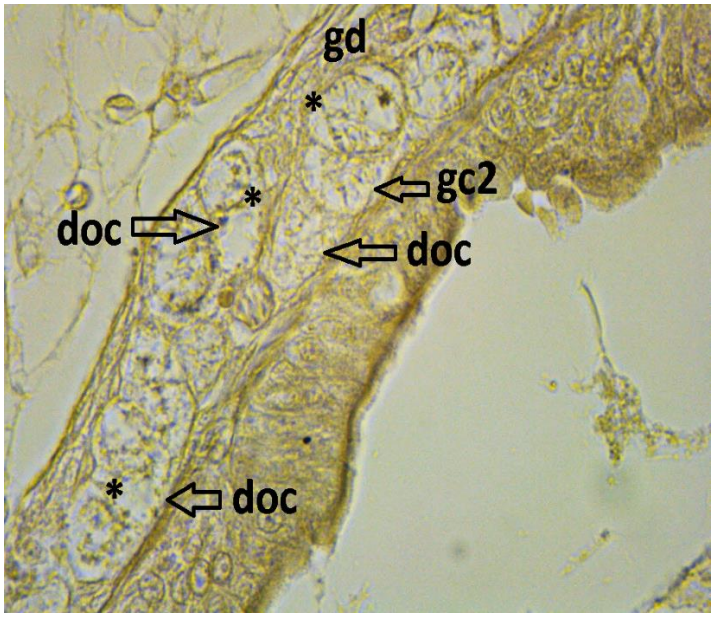
Şekil 4.192. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısında görülen spermatositler, st: seminifer tübül, sg: spermatogonyum, pst: primer spermatosit, PAS boyama, x100.

0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 57. gününde, gonad yapısında goniyal hücreler, tip 2 germ hücreleri ve dejenere olmuş pek çok oosit tespit edildi

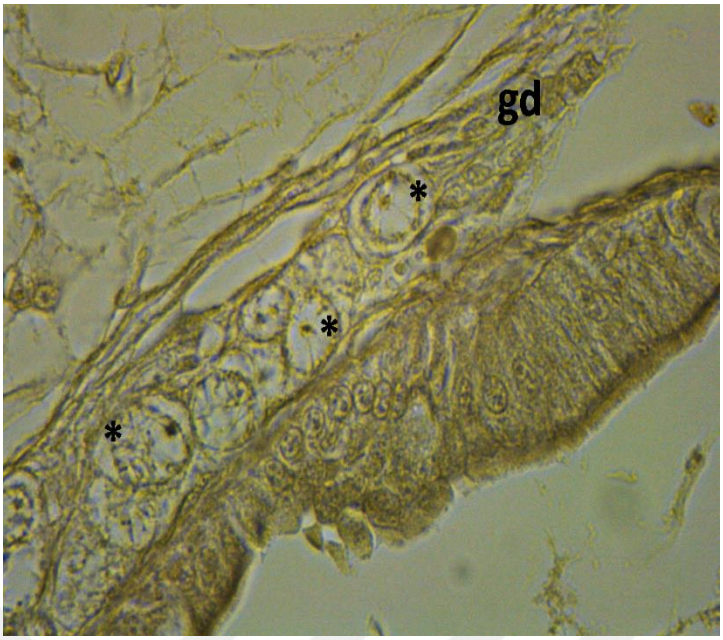
(Şekil 4.193. ve Şekil 4.194). 0,5 mg/L LAS uygulamasının oositlerin sitoplazmasında vakuolizasyona sebep olduğu görüntülendi (Şekil 4.194. ve Şekil 4.195.).



Şekil 4.193. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. gn: goniyal hücre, gc2: tip 2 germ hücresi, doc: dejenere oosit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

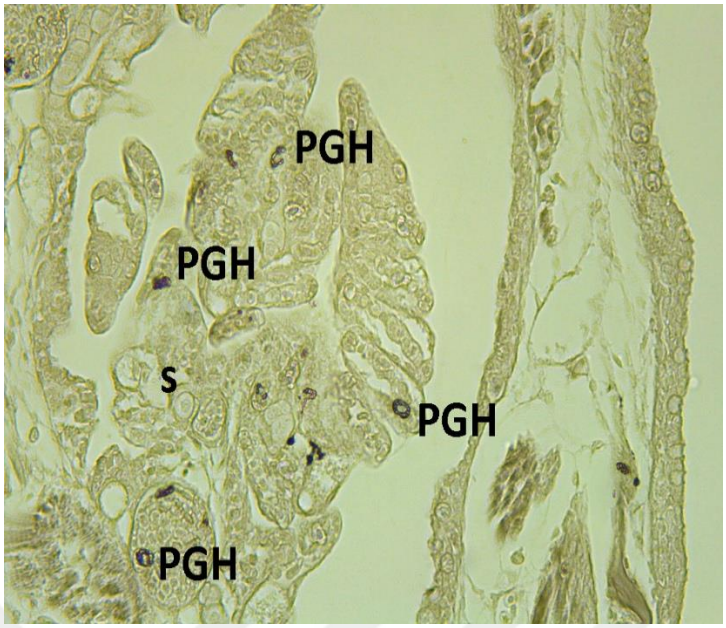


Şekil 4.194. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. gc2: tip 2 germ hücresi, doc: dejenere oosit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

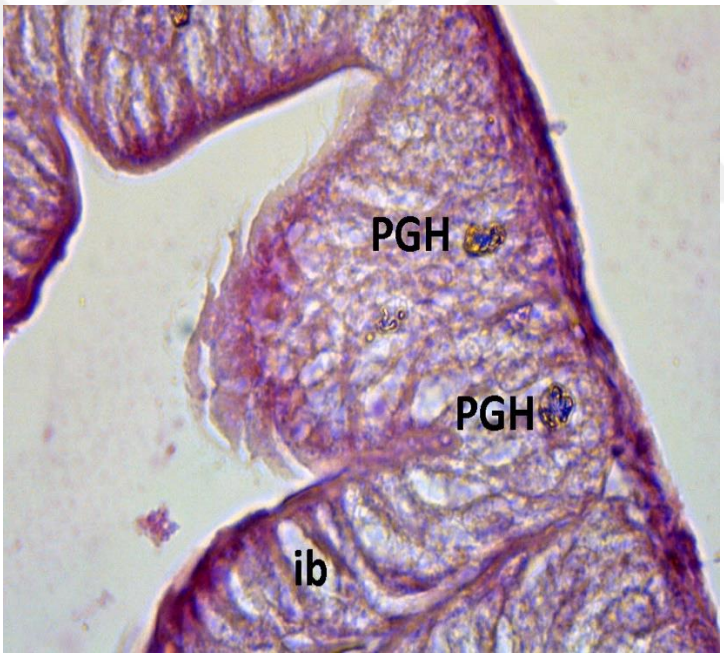


Şekil 4.195. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı. gd: gonad, *: vakuolizasyon. Alkalin Fosfataz boyama, x100.

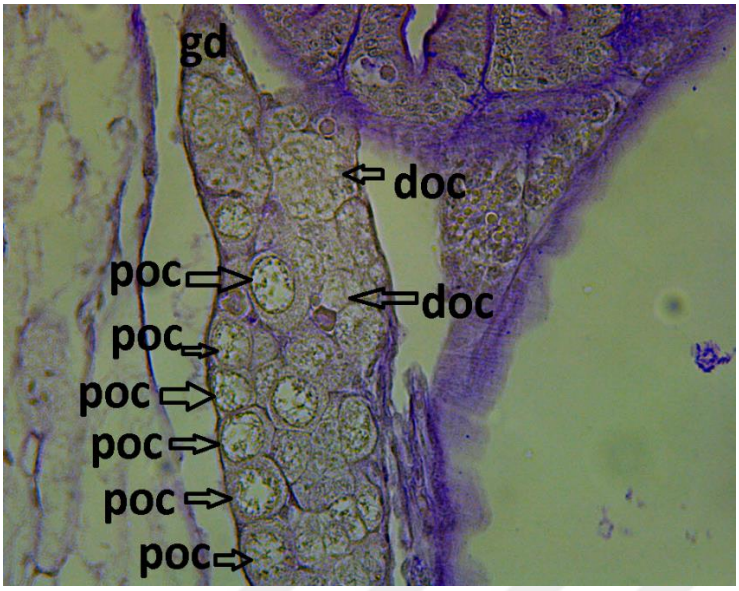
0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 60. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.196.), kalpte, ince barsakta (Şekil 4.197.) iğ şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 0,5 mg/L LAS uygulaması sonucu, beyinde göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücreleri görüldü. Gonad yapısı incelendiğinde goniyal hücrelerin ve perinükleolar oositlerin yanı sıra dejenere olmuş pek çok foliküle rastlandı (Şekil 4.198. ve Şekil 4.199.). 0,25 mg/L'lik grup ile kıyaslandığında 0,5 mg/L LAS uygulamasının foliküllerde daha fazla hasara sebep olduğu tespit edildi. LAS uygulamasının zebra balığı larvalarında gametogeneze ket vurduğu görüldü.



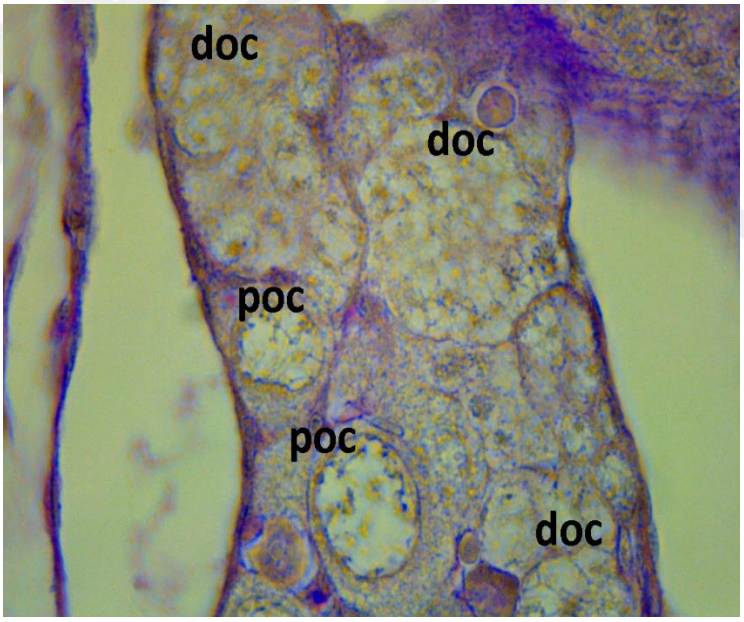
Şekil 4.196. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Alkalin Fosfataz boyama, x40.



Şekil 4.197. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.



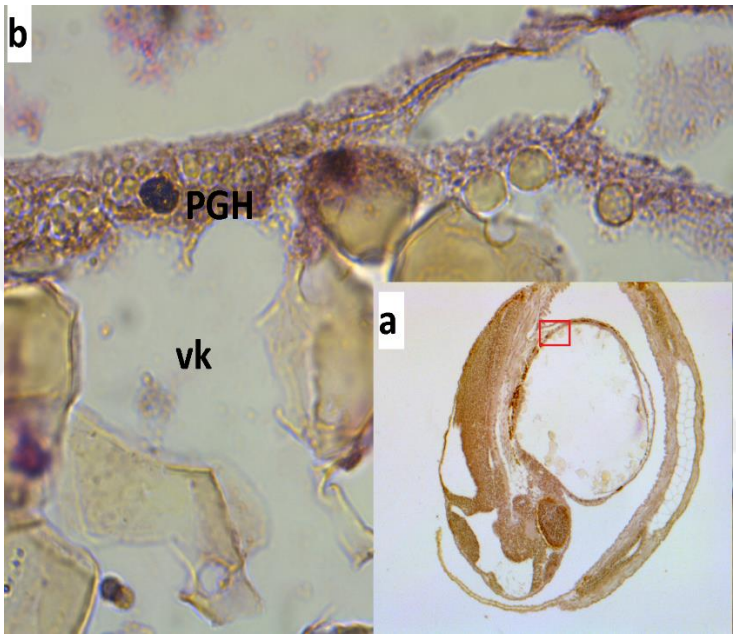
Şekil 4.198. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. gd: gonad, poc: perinükleolar oosit, doc: dejenere oosit, PAS boyama, x40.



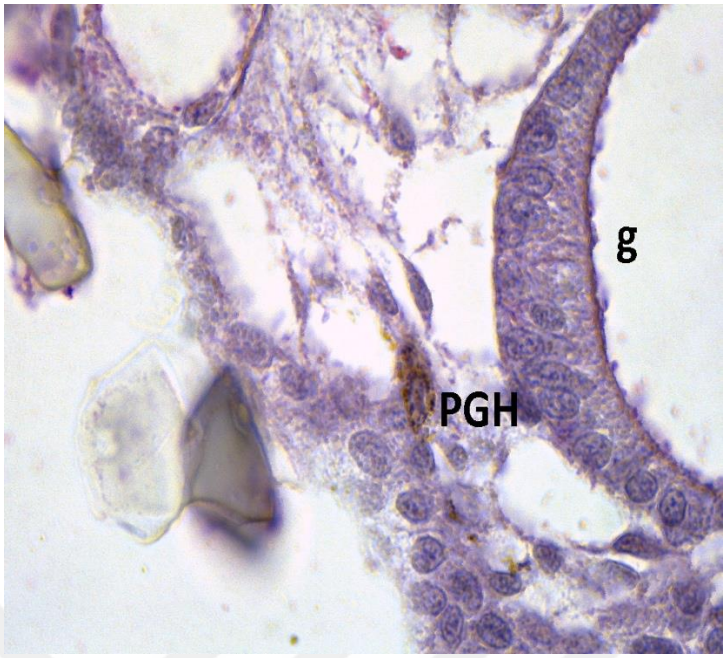
Şekil 4.199. 0,5 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. poc: perinükleolar oosit, doc: dejenere oosit, PAS boyama, x100.

4.6.4. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup

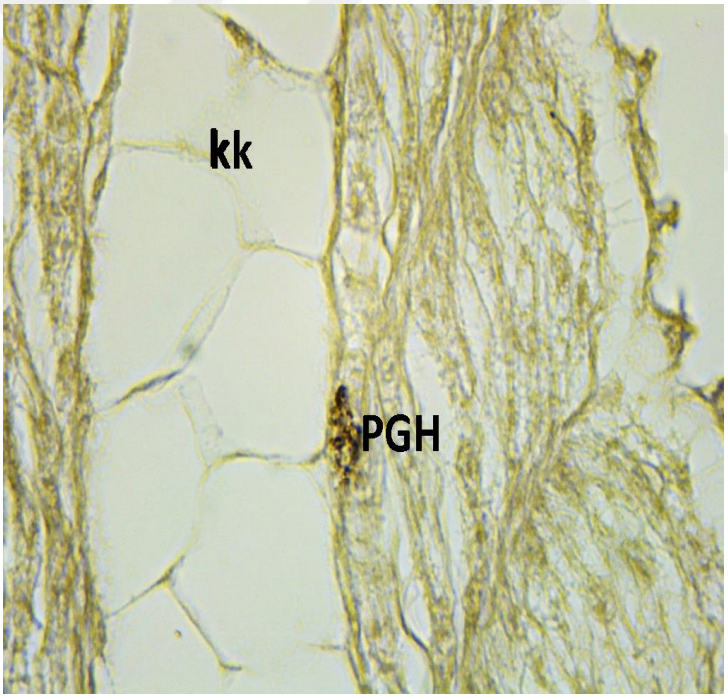
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 1. gününde, vitellus kesesinin dorsalinde yuvarlak şekilli primordiyal germ hücreleri tespit edildi (Şekil 4. 200.). Bu hücrelerin, bol miktarda glikojen granülü içerdiği yapılan Best Carmin boyaması sonucunda görüldü. 1 mg/L LAS uygulaması sonucunda göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücreleri, vitellus kesesinin ventralinde, göz kenarında (Şekil 4.201.) ve kuyrukta (Şekil 4.202.) tespit edildi.



Şekil 4.200. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde vitellus kesesi dorsalinde görülen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, vk: vitellus kesesi, Best Carmin boyama, a-x10, b-x100.



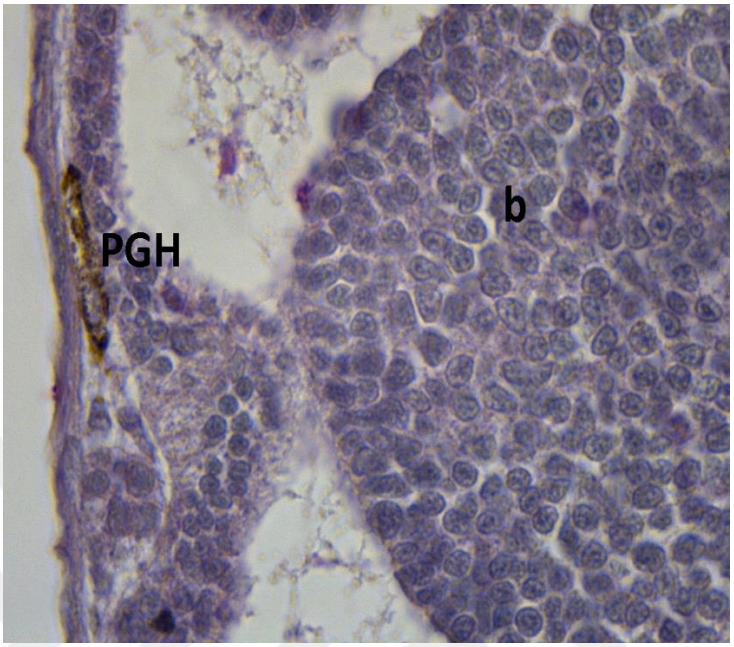
Şekil 4.201. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde göz kenarında tespit edilen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x100.



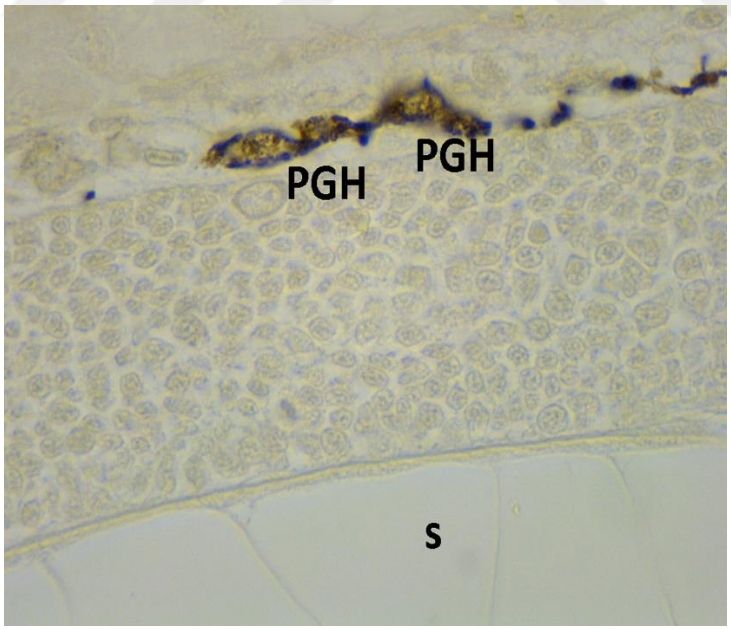
Şekil 4.202. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 1. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kuyruk, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 2. gününde, vitellus kesesinin dorsalinde primordiyal germ hücreleri görüldü. 1 mg/L LAS uygulaması sonucu göç

yolundan ayrılan primordiyal germ hücreleri, vitellus kesesinin ventralinde, beyinde (Şekil 4.203.) ve somitlerin dorsalinde (Şekil 4.204.) tespit edildi.



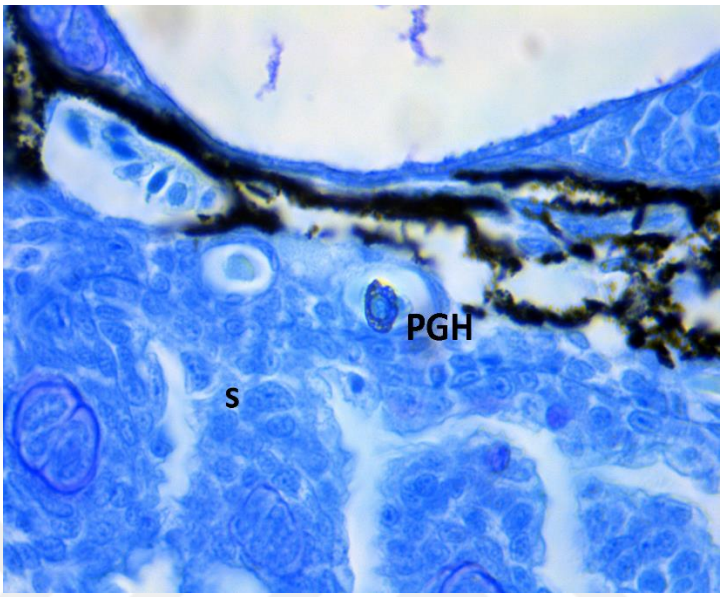
Şekil 4.203. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, PAS boyama, x100.



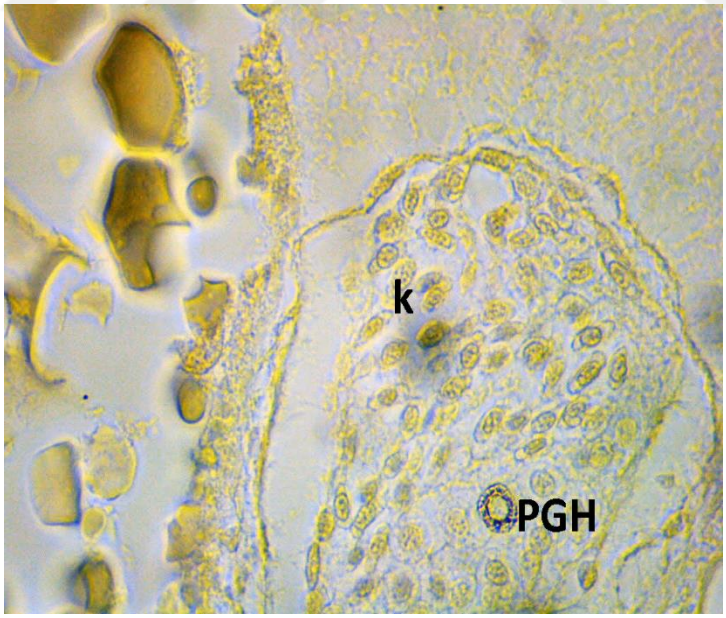
Şekil 4.204. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 2. günde somitlerin dorsalinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: somit, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 3. gününde, yapılan histolojik boyamalar sonucunda solungaç lamellerinde (Şekil 4.205.), kalpte (Şekil 4.206.) ve

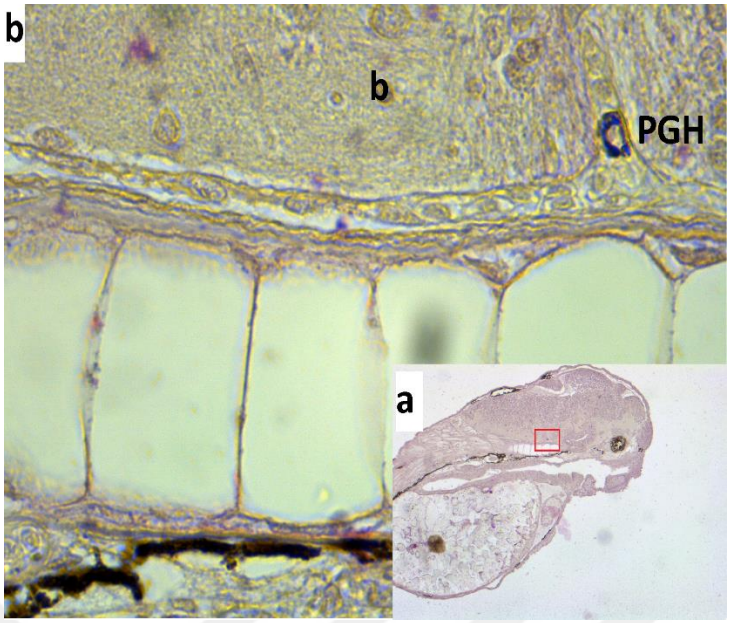
karaciğerde gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Ektopik primordiyal germ hücreleri, somitlerin kenarında, vitellus kesesinin ventralinde ve beyinde (Şekil 4.207.) görüntülendi.



Şekil 4.205. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.

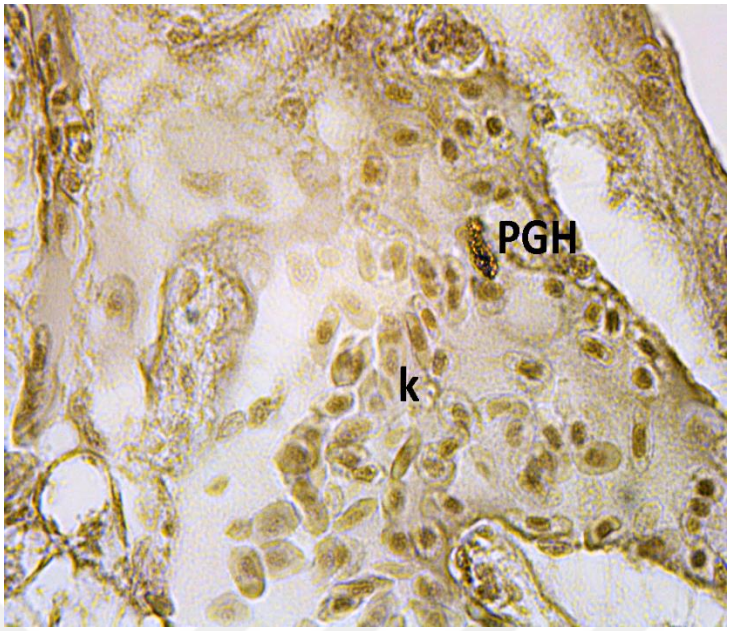


Şekil 4.206. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

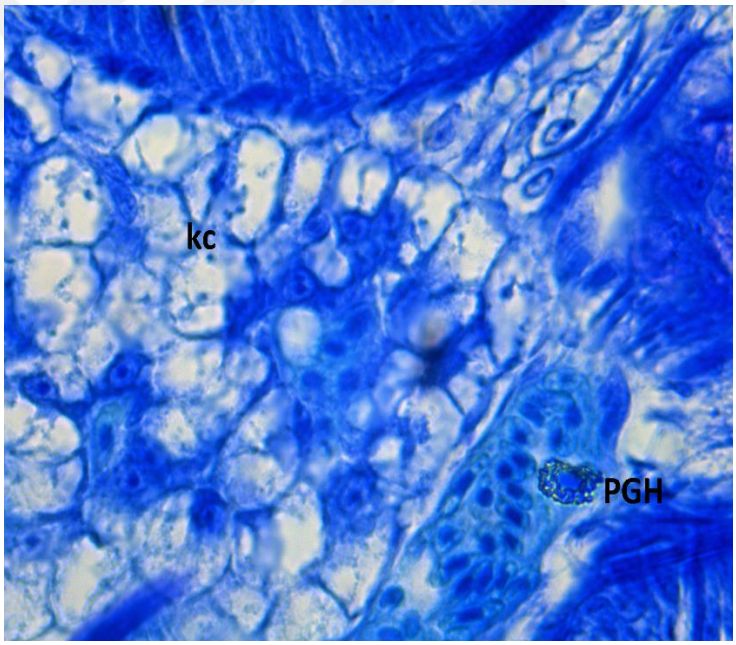


Şekil 4.207. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 3. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, a-x10, b-x100.

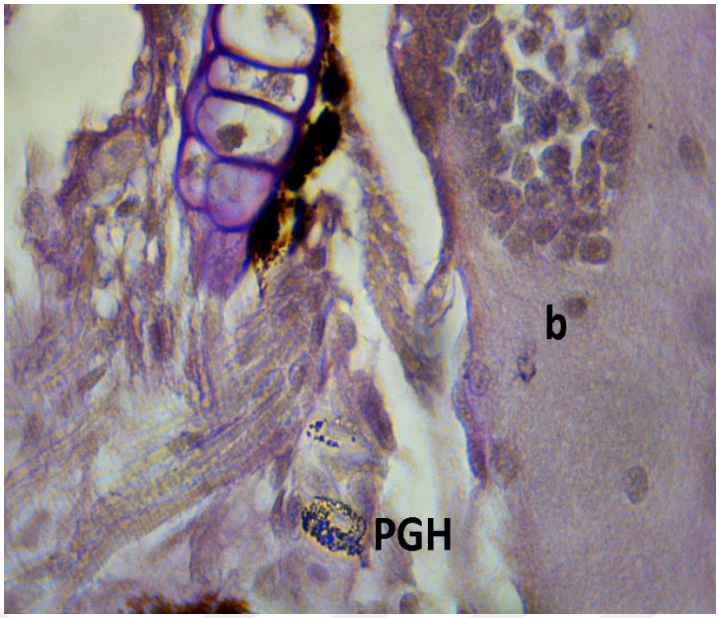
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 5. gününde, kalpte (Şekil 4.208.), karaciğerde (Şekil 4.209.) ve ince barsakta göç etmekte olan iğ şekilli primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Bu hücreler, sitoplazmalarında bol miktarda nuage materyali ve glikojen taneleri içerdiklerinden, Toluidin mavisi ve PAS boyaları ile pozitif reaksiyon verdikleri görüldü. 1 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücrelerine beyinde rastlandı (Şekil 4.210.).



Şekil 4.208. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

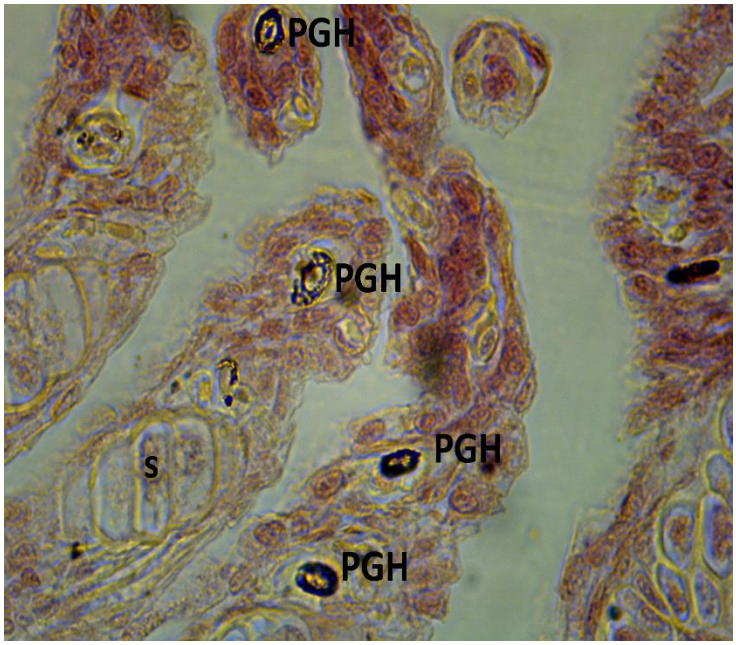


Şekil 4.209. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Toluidin mavisi boyama, x100.

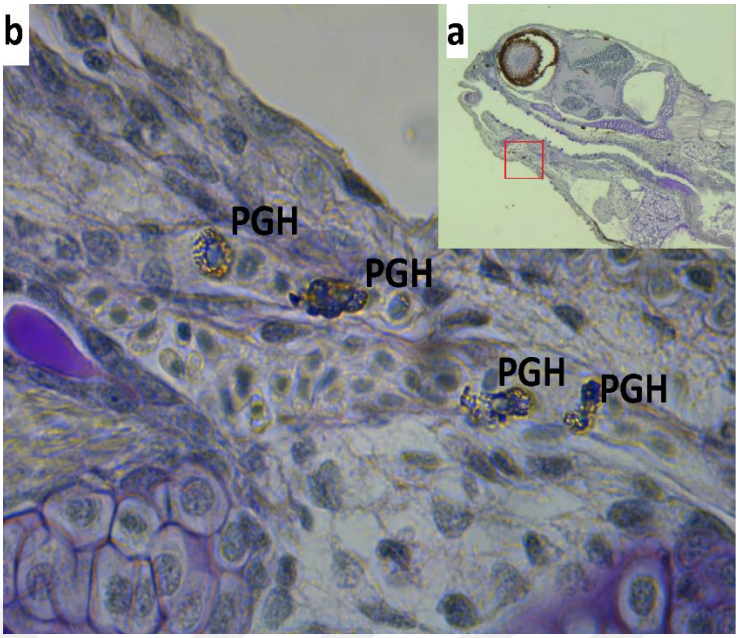


Şekil 4.210. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 5. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, PAS boyama, x100.

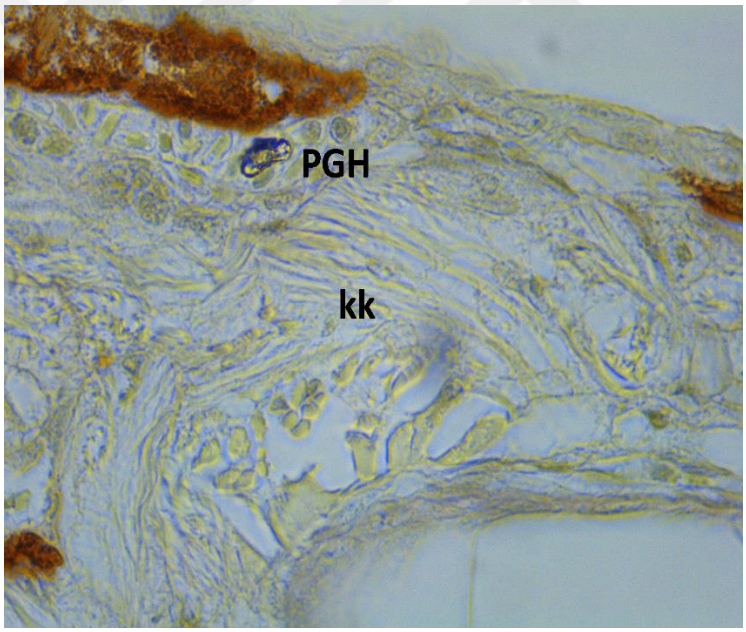
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 7. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.211.), kalpte, özofagusta ve ince barsakta primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması sonucu, alt çenede (Şekil 4.212.) ve kuyrukta (Şekil 4.213.) göç yolundan ayrılmış amorf şekilli ve bol granüllü primordiyal germ hücreleri görüntülendi.



Şekil 4.211. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde solungaçta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Best Carmin boyama, x100.



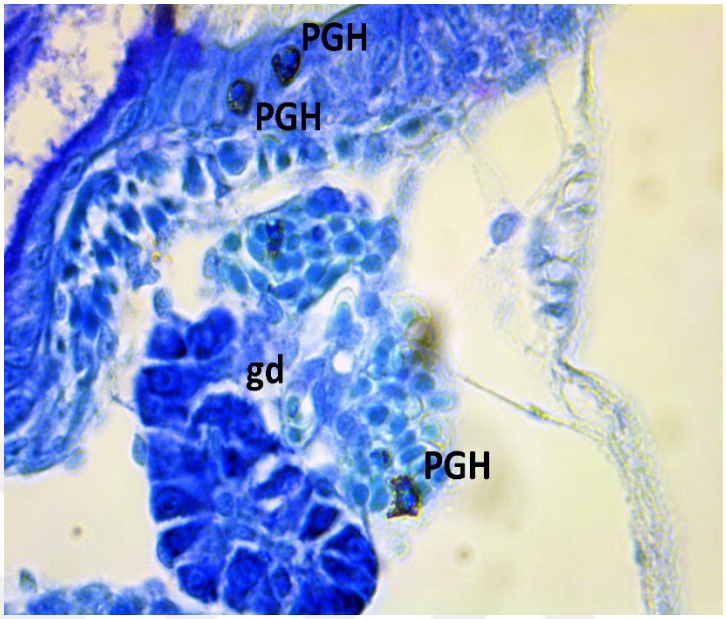
Şekil 4.212. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde alt çenede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, a-x10, b-x100.



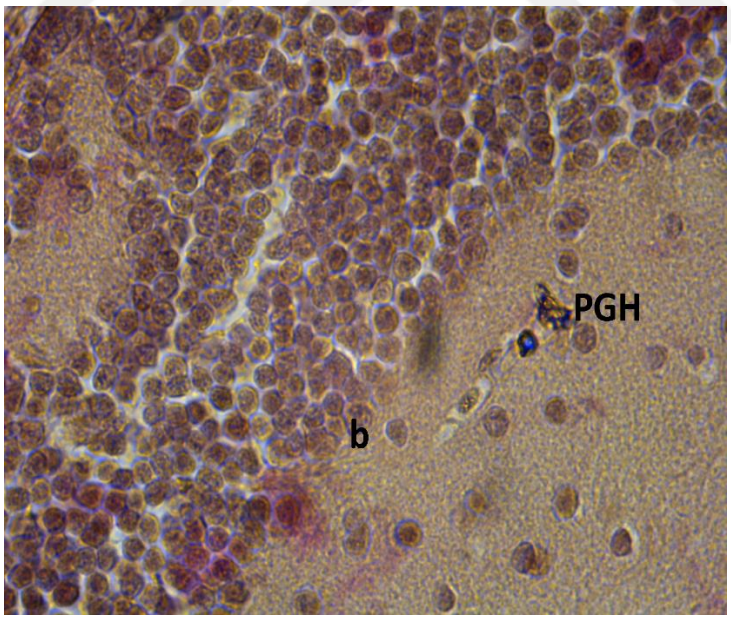
Şekil 4.213. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 7. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 10. gününde özofagusta ve gonadal bölgede (Şekil 4.214.) ameboid hareketlerle göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Beyinde (Şekil 4.215.) ve böbrekte göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri görüntülendi. 12. günde ise, solungaç lamellerinde, kalpte (Şekil 4.216.) ve ince barsakta gonad taslaklarına doğru göç eden primordiyal germ

hücreleri tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması sonucu böbrekte ve kuyrukta (Şekil 4.217.) göç yolundan ayrılmış ektopik primordiyal germ hücreleri gözlendi.



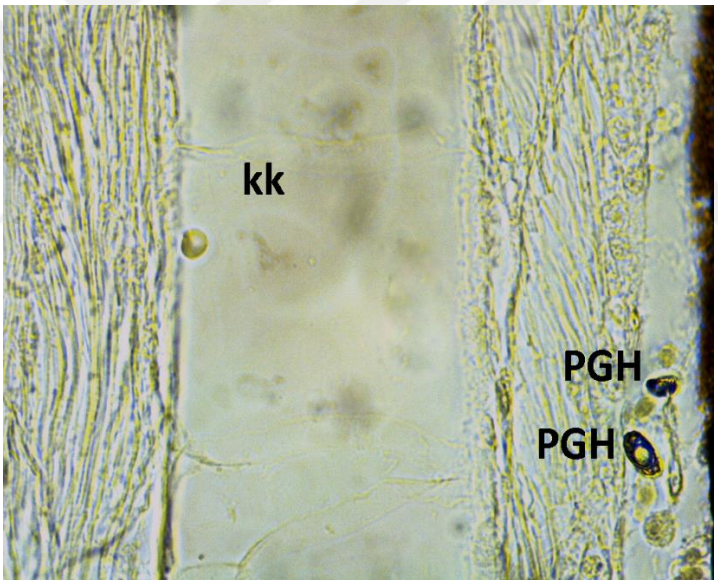
Şekil 4.214. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.215. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 10. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, x100.



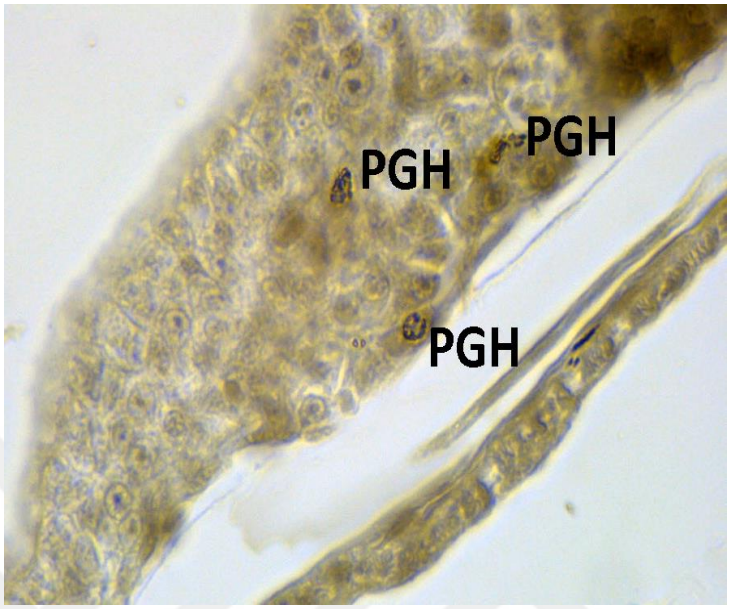
Şekil 4.216. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



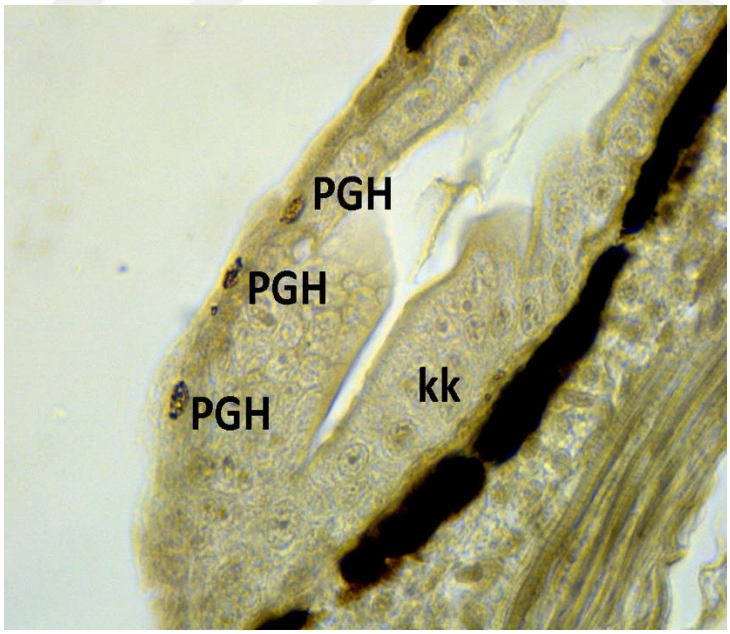
Şekil 4.217. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 12. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kk: kuyruk, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 13. gününde, kalpte, karaciğerde ve gonadal bölgede (Şekil 4.218.) alkalin fosfataz aktivitesine sahip primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Somitlerin dorsalinde ve ventralinde, kuyrukta (Şekil 4.219.), böbrekte ve beyinde (Şekil 4.220.) ektopik primordiyal germ hücreleri görüldü. Yapılan Best Carmin boyaması sonucunda beyinde gözlenen primordiyal germ

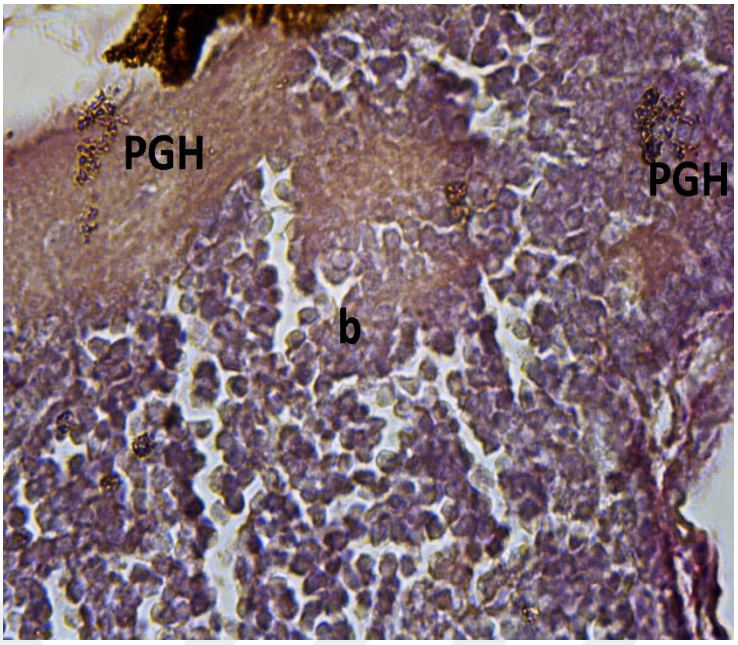
hücrelerinin, amorf şekilli oldukları ve sitoplazmalarında bol miktarda glikojen granülleri içerdikleri görüldü



Şekil 4.218. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde gonadal bölgede gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

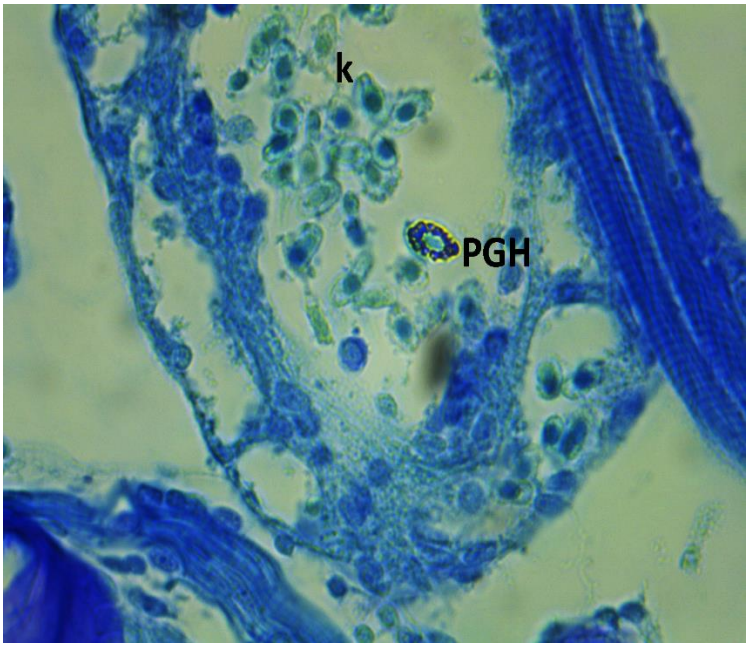


Şekil 4.219. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

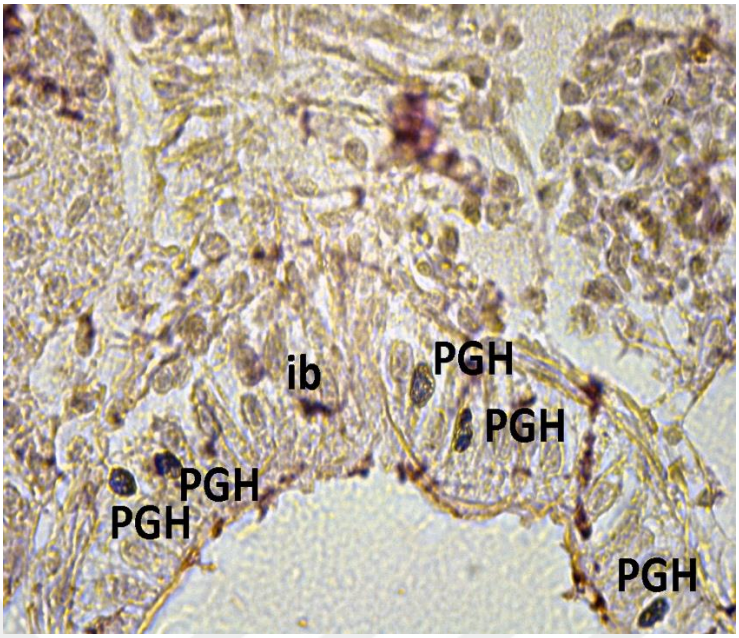


Şekil 4.220. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 13. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 16. gününde, kalpte (Şekil 4.221.), karaciğer ve ince barsakta (Şekil 4.222.) gonad taslaklarına göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri görüntülendi. İncelenen histolojik kesitlerde bu hücrelerin büyük nükleusa sahip iğ şekilli hücreler oldukları görüldü.

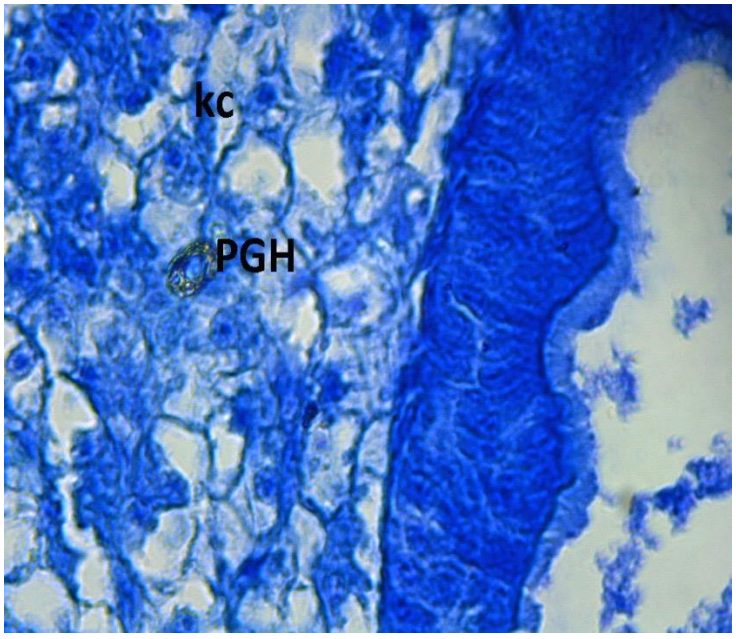


Şekil 4.221. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde kalpte gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, k: kalp, Toluidin mavisi boyama, x100.

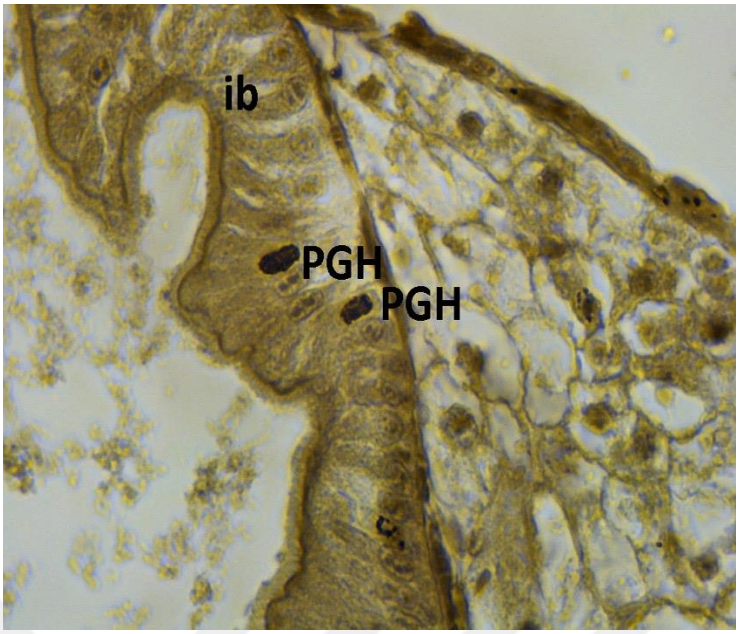


Şekil 4.222. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 16. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.

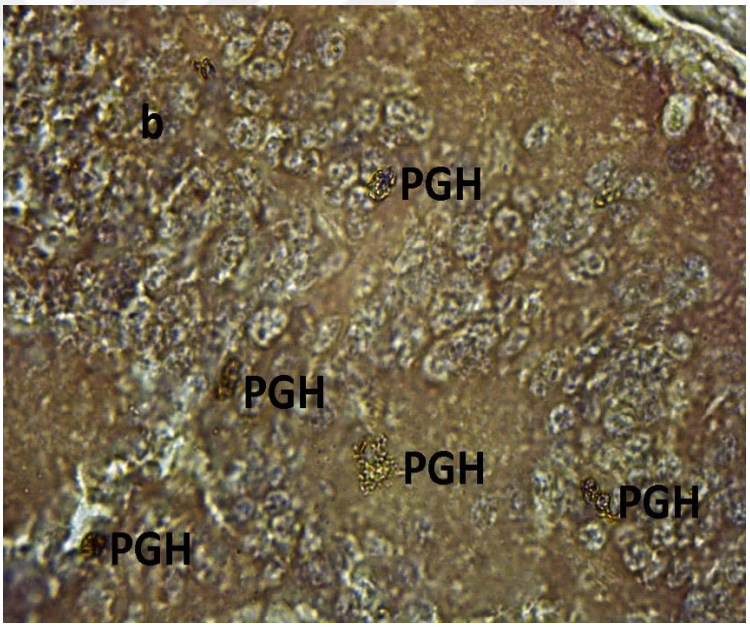
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 17. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde (Şekil 4.223.), ince barsakta (Şekil 4.224.) ve gonadal bölgede göç eden primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması sonucunda beyinde (Şekil 4.225.) ve gözde (Şekil 4.226.) göç yolundan ayrılan ektopik primordiyal germ hücreleri görüntülendi.



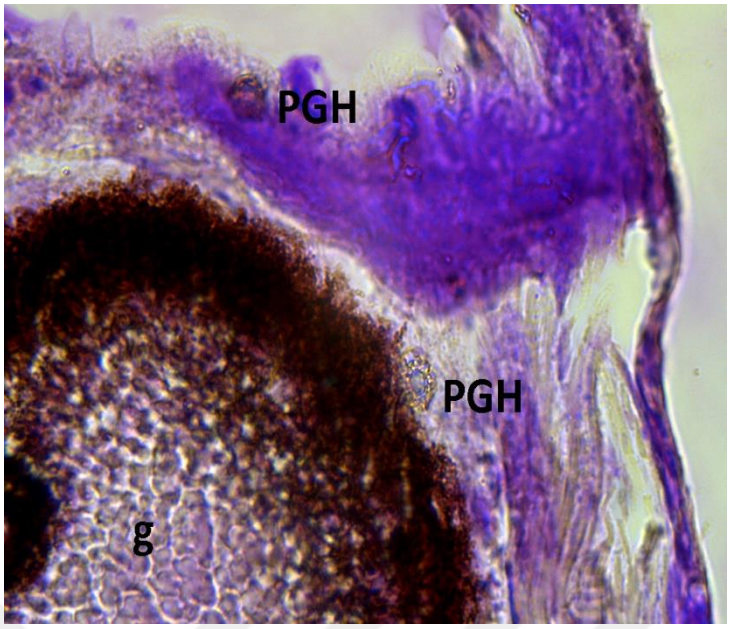
Şekil 4.223. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.224. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Alkalin Fosfataz boyama, x100.



Şekil 4.225. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde beyinde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, b: beyin, Best Carmin boyama, x100.

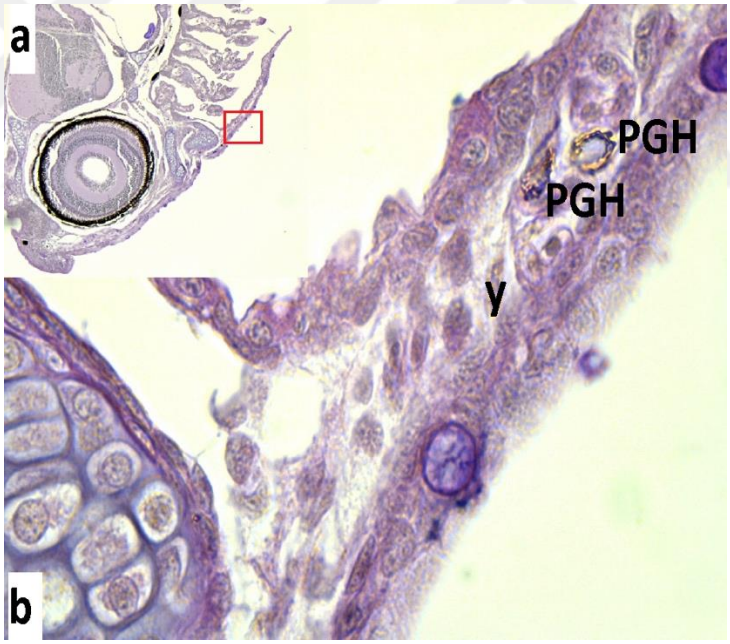


Şekil 4.226. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 17. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, PAS boyama, x100.

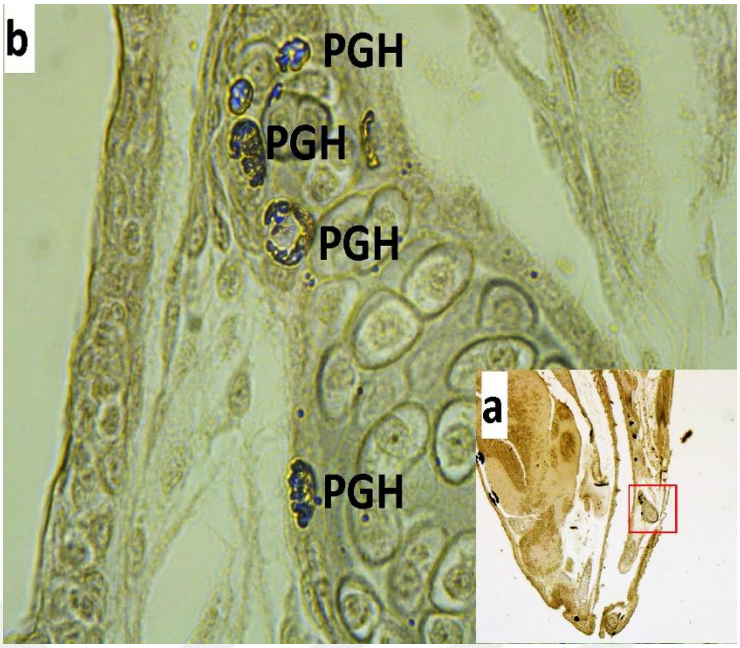
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 19. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde, özofagusta ve ince barsakta (Şekil 4.227.) gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Yapılan histolojik boyamalar sonucunda, alt çenede (Şekil 4.228.), gözde, beyinde ve ventral yüzgeçte (Şekil 4.229.) göç yolundan ayrılmış primordiyal germ hücreleri görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gonad yapısında farklılaşmanın henüz başlamadığı tespit edildi. Yapılan histolojik boyamalar sonucunda, gonadal bölgedeki bazı farklılaşmamış hücrelerin, hücre bütünlüğünün bozulduğu belirlendi (Şekil 4.230.).



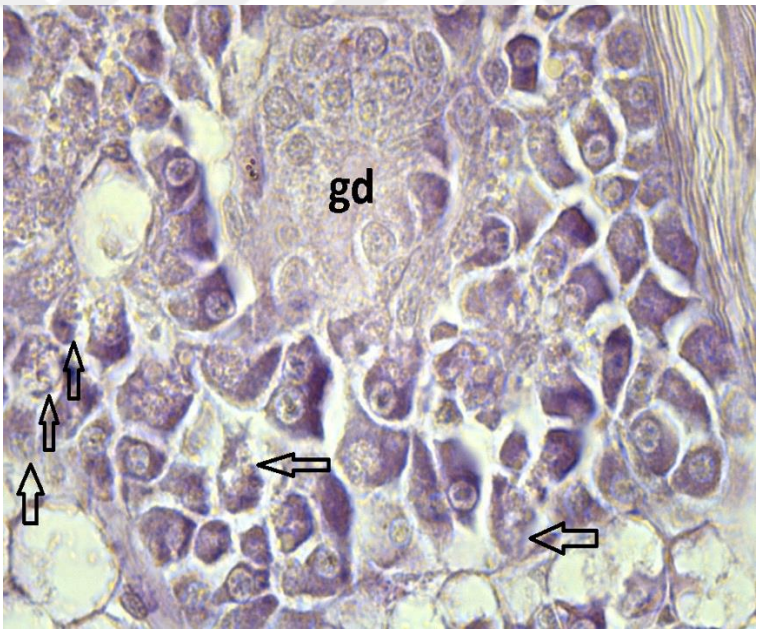
Şekil 4.227. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ince barsakta tespit edilen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Best Carmin boyama, x100.



Şekil 4.228. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde ventral yüzgeçte görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, y: yüzgeç, PAS boyama, a-x10, b-x100.



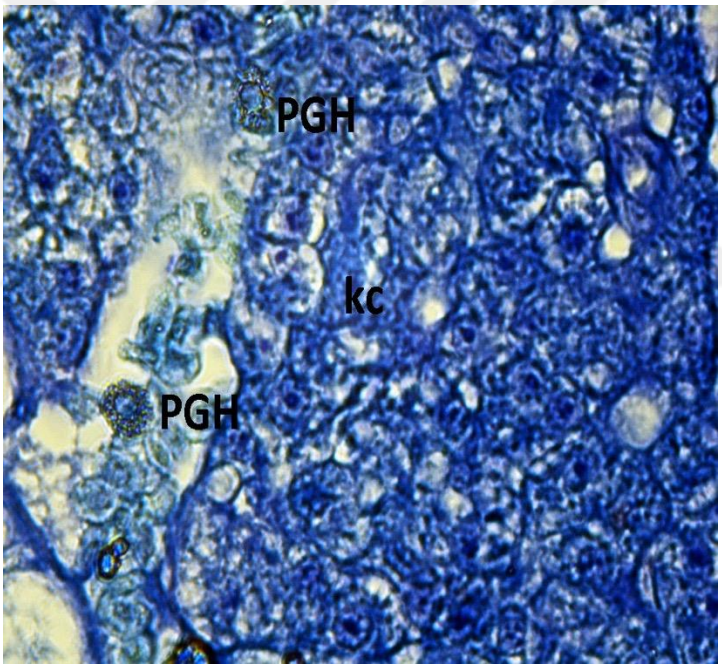
Şekil 4.229. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. günde alt çenede görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, Alkalin Fosfataz boyama, a-x10, b-x100.



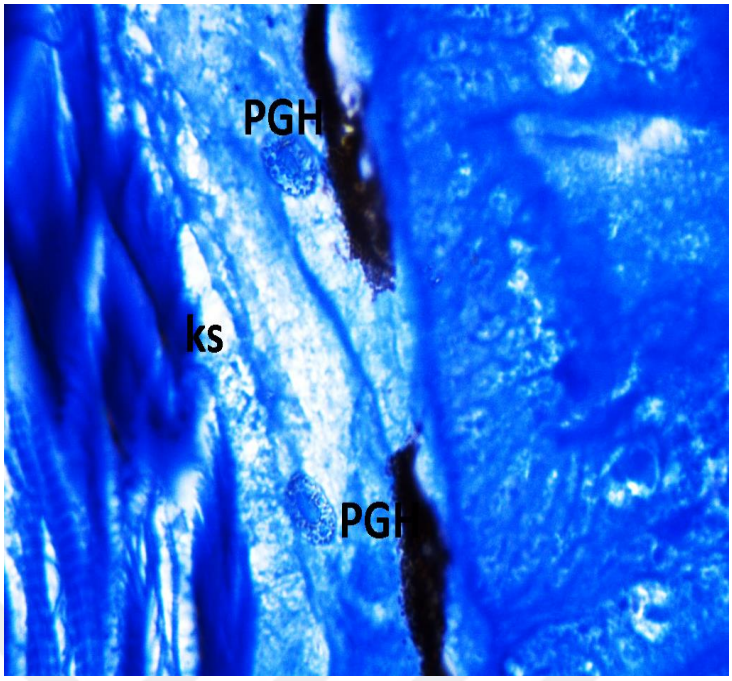
Şekil 4.230. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 19. gonad yapısı, ok: hücre bütünlüğünü kaybetmiş hücre. PAS boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 25. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde (Şekil 4.231.), ince barsakta ve gonadal bölgede göç etmekte olan primordiyal germ hücrelerine rastlandı. Bu hücreler, somatik hücreler ile kıyaslandığında daha büyük boyutlu, daha iri çekirdekli ve bol granüllü hücrelerdi. Primordiyal germ hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan elektronca yoğun

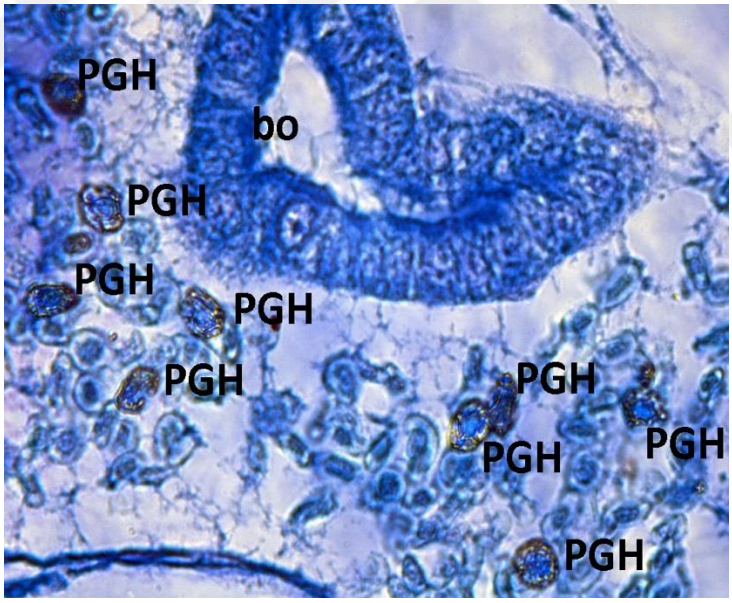
granüllerin (nuage materyali) katyonik bir boya olan Toluidin mavisi ile pozitif sonuç vererek farklı bir şekilde boyandığı görüldü. 1 mg/L LAS uygulaması sonucunda ventral yüzgeçte, kas tabakasında (Şekil 4.232.), böbrekte (Şekil 4.233.), gözde ve beyinde çok sayıda ektopik primordiyal germ hücresine rastlandı. Kontrol grubu ve diğer LAS uygulaması yapılmış gruplar ile karşılaştırıldığında göç yolundan ayrılmış primordiyal germ hücrelerin dağılımının ve sayısının fazla olduğu görüldü. Gonad yapısı incelendiğinde, küçük bir kısımda gonadal farklılaşmanın başladığı görüldü. İncelenen kesitlerde goniyal hücreler gözlendi (Şekil 4.234.). Tip 1 ve tip 2 germ hücrelerine rastlanmadı. Kontrol grubu ile kıyaslandığında gonadal farklılaşmanın geciktiği sonucuna varıldı. LAS uygulamasının primordiyal germ hücrelerinin göçüne ve gonad farklılaşmasına ket vurduğu tespit edildi.



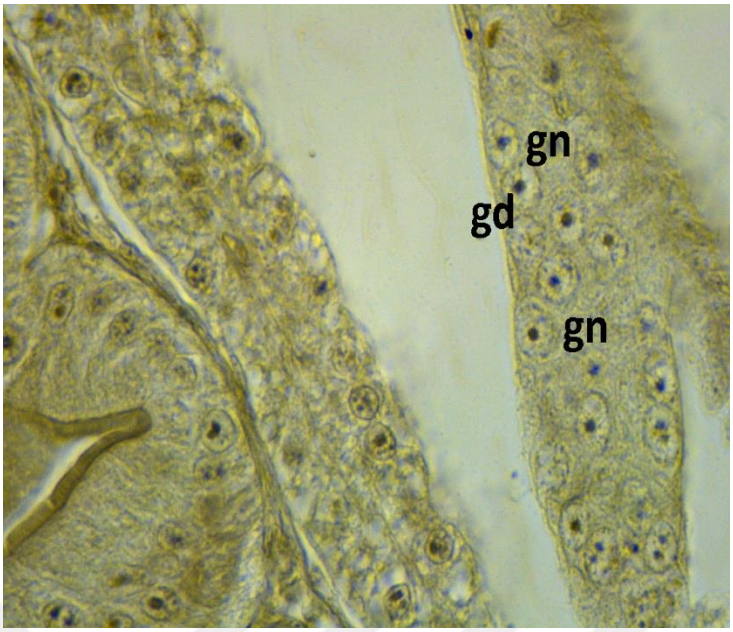
Şekil 4.231. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde karaciğerde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.232. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde kas tabakasında görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ks: kas tabakası, Toluidin mavisi boyama, x100.

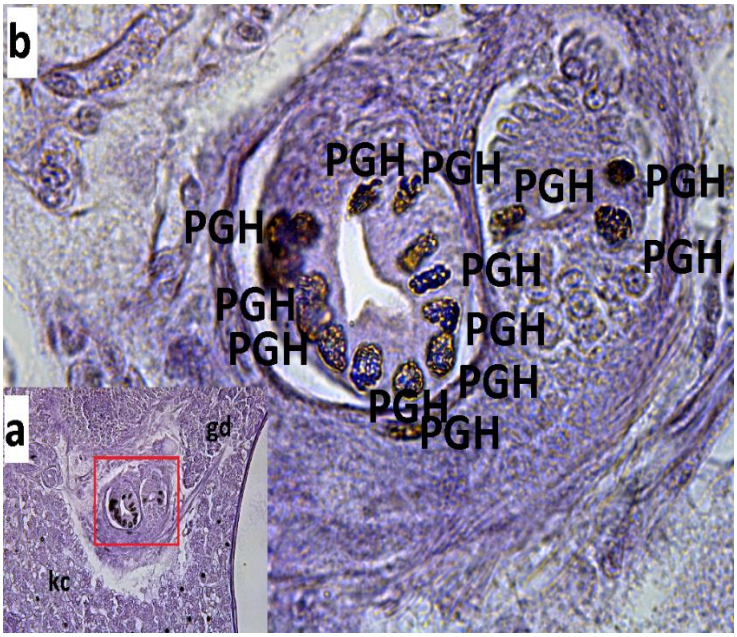


Şekil 4.233. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde böbrekte görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, bo: böbrek, Toluidin mavisi boyama, x100.

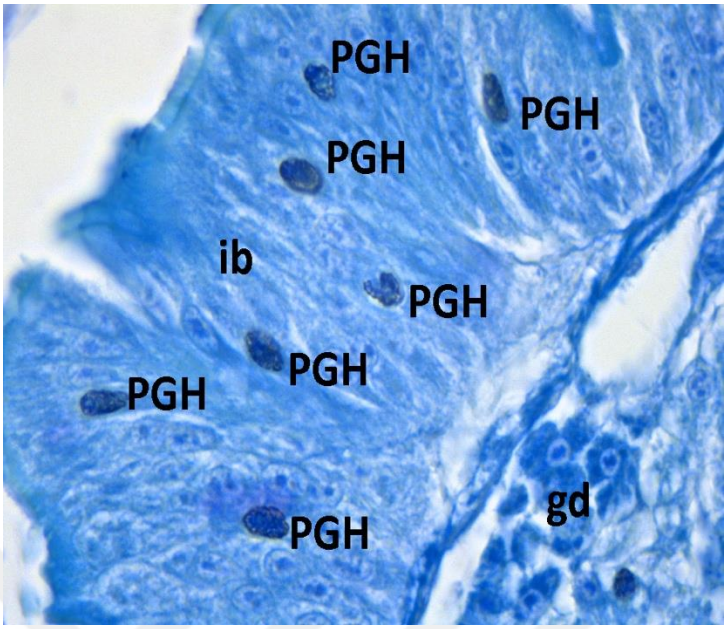


Şekil 4.234. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 25. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, Alkalin Fosfataz boyama, x100.

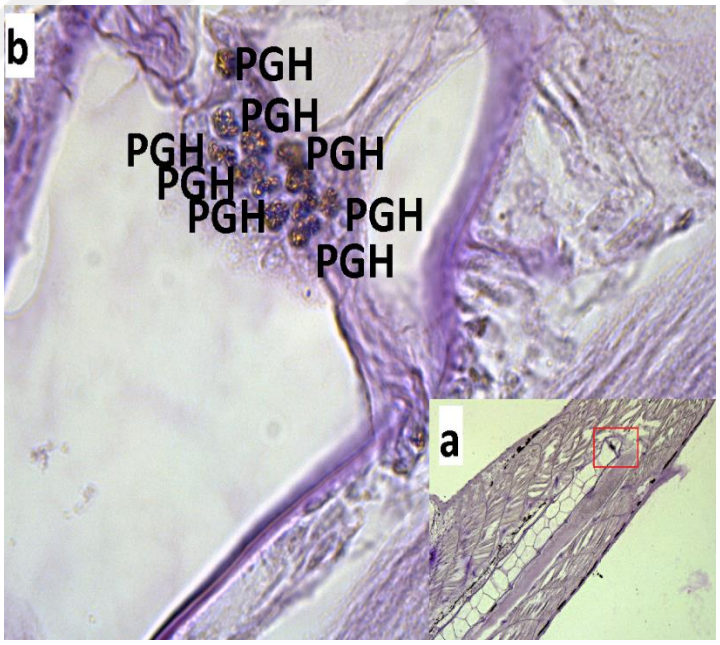
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 29. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde (Şekil 4.235.), ince barsakta (Şekil 4.236.) ve gonadal bölgede primordiyal germ hücreleri tespit edildi. 1 mg/L LAS uygulaması sonucunda kas tabakasında ve kuyrukta göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücrelerine rastlandı (Şekil 4.237.).



Şekil 4.235. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde karaciğerde gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, kc: karaciğer, PAS boyama, a-x40, b x100.



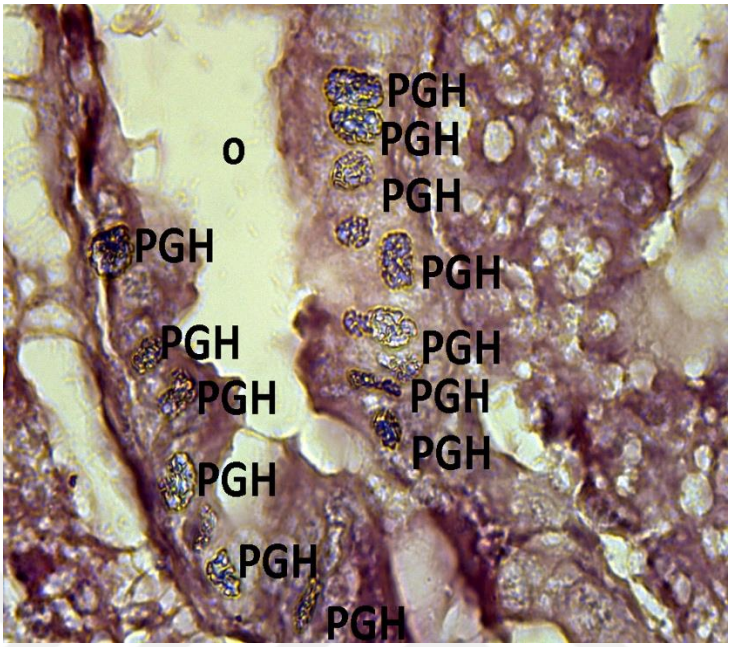
Şekil 4.236. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, gd: gonad, ib: ince barsak, Toluidin mavisi boyama, x100.



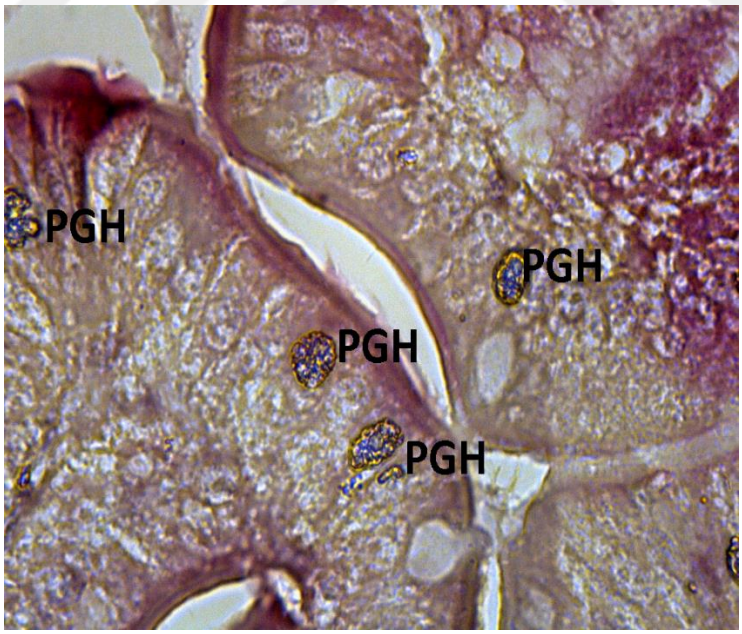
Şekil 4.237. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 29. günde kuyrukta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, PAS boyama, a-x10, b-x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 33. gününde, solungaç lamellerinde, kalpte, karaciğerde, özofagusta (Şekil 4.238.) ve ince barsakta (Şekil 4.239) gonad taslaklarına doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Böbrekte, kuyrukta, beyinde ve gözde (Şekil 4.240.) göç yolundan ayrılmış çok

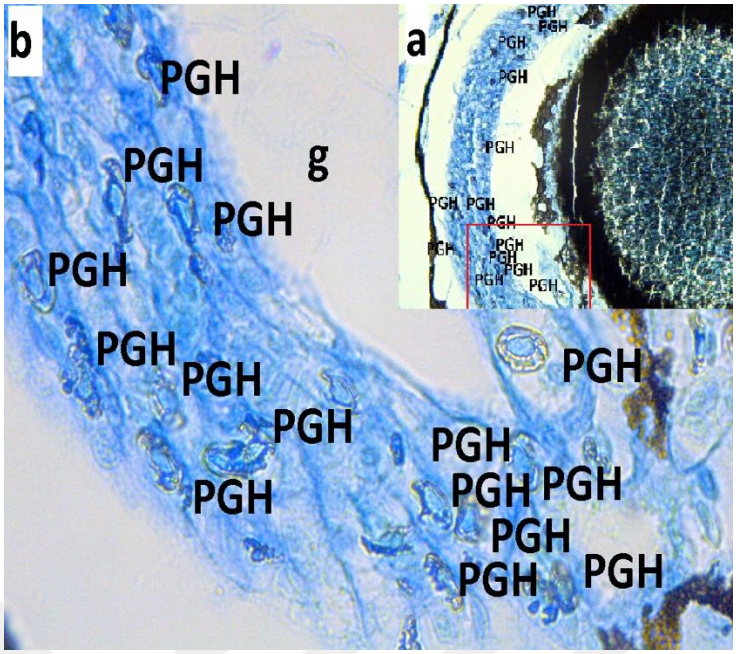
sayıda primordiyal germ hücresi görüntülendi. Gonad yapısı incelendiğinde çok sayıda goniyal hücre ile birkaç perinükleolar oosit görüntülendi (Şekil 4.241).



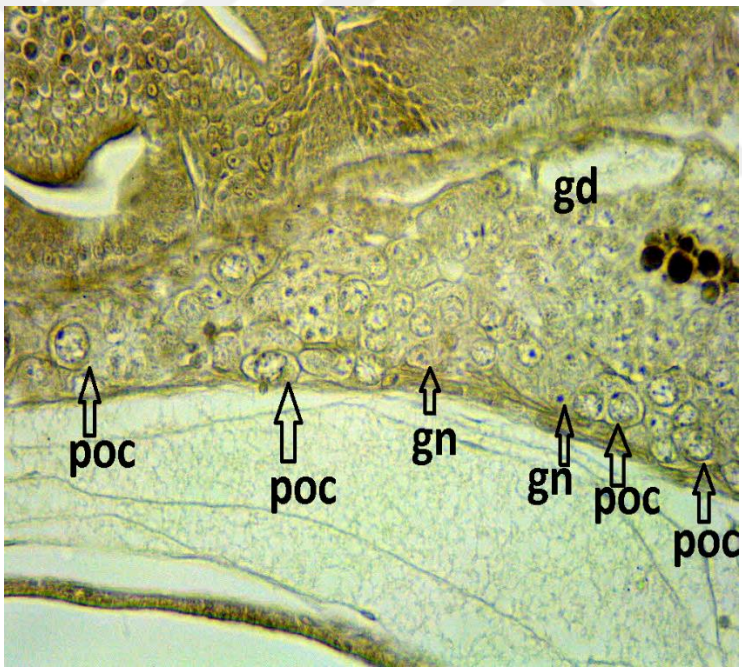
Şekil 4.238. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde özofagusta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, o: özofagus, Best Carmin boyama, x100.



Şekil 4.239. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde ince barsakta gözlenen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, Best Carmin boyama, x100.



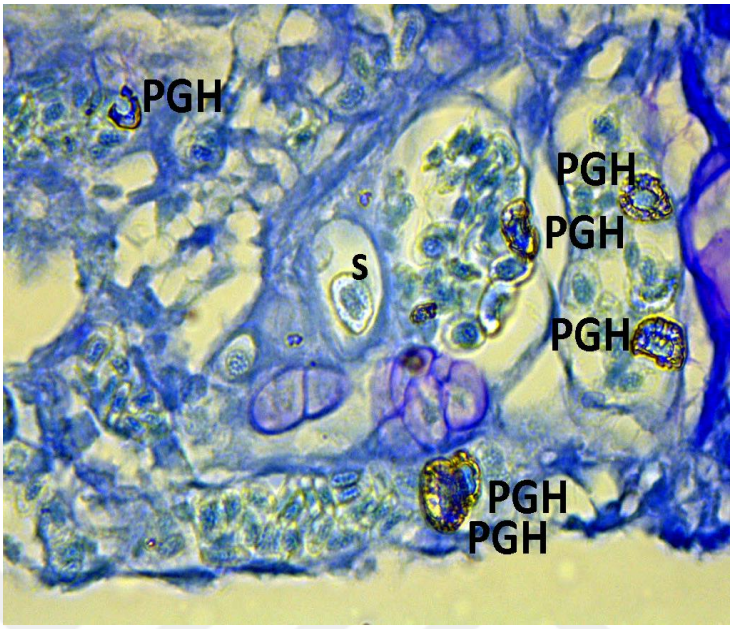
Şekil 4.240. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gözde tespit edilen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, Toluidin mavisi boyama, a-x40, b-x100.



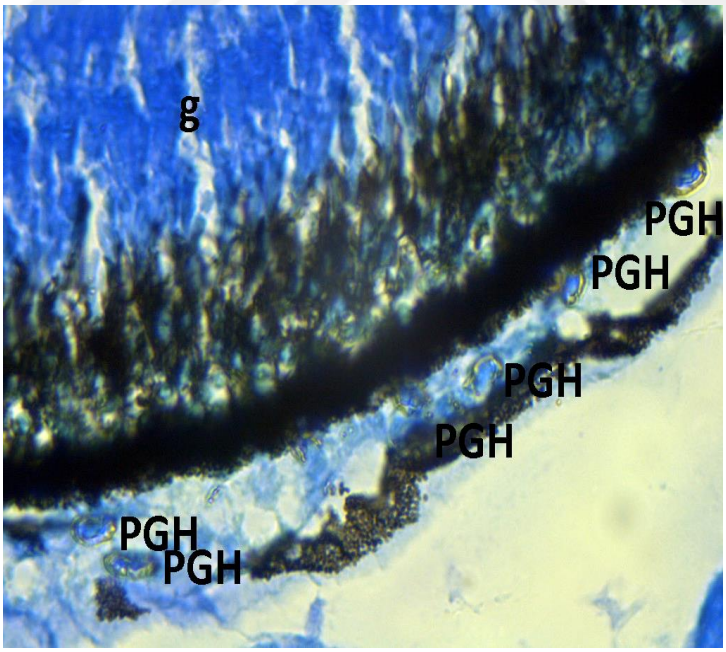
Şekil 4.241. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 33. günde gonad yapısı, gd: gonad, gn: goniyal hücre, poc: perinükleolar oosit, Alkalin Fosfataz boyama, x40.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 37. gününde solungaç lamellerinde (Şekil 4.242.), kalpte, karaciğerde ve ince barsakta primordiyal germ hücrelerine rastlandı. 1 mg/L LAS uygulaması sonucunda beyinde ve göz etrafında göç yolundan ayrılan pek çok primordiyal germ hücresi (Şekil 4.243.) tespit edildi. Gonad yapısı

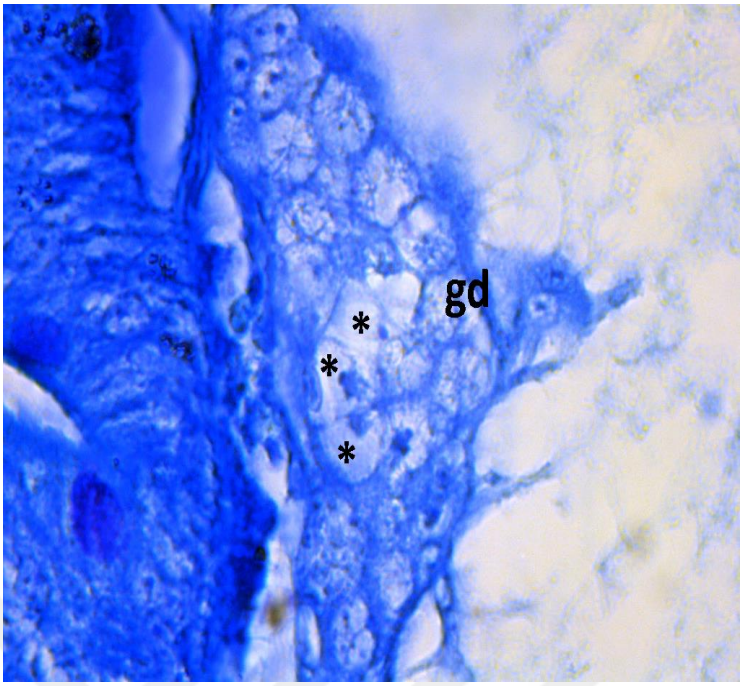
incelendiğinde, goniyal hücrelerde vakuolizasyon tespit edildi (Şekil 4.244.). Perinükleolar oositlerin yanısıra dejenere oositler görüldü (Şekil 4.245.).



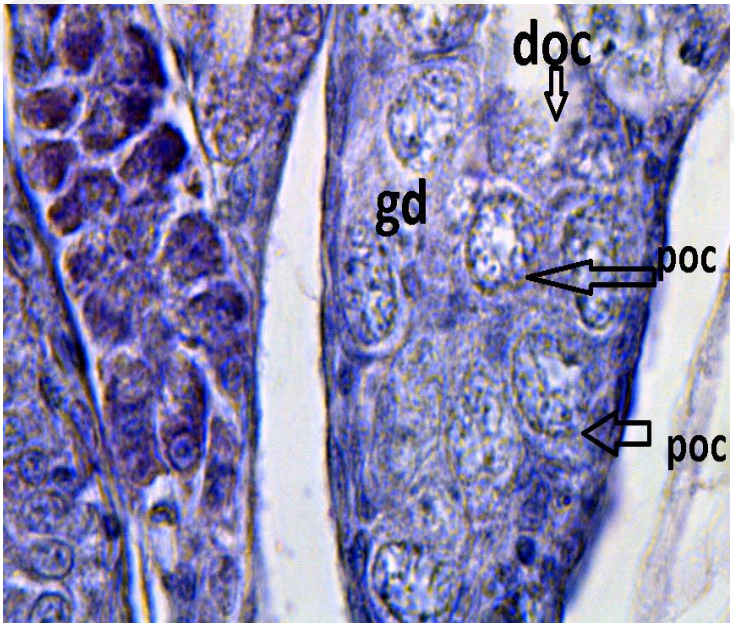
Şekil 4.242. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama, x100.



Şekil 4.243. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gözde görülen primordiyal germ hücresi. PGH: primordiyal germ hücresi, g: göz, Toluidin mavisi boyama, x100.



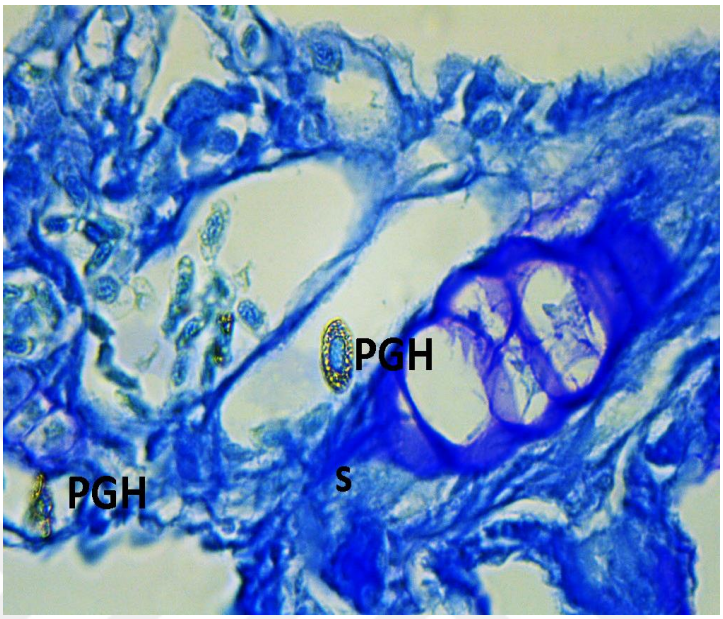
Şekil 4.244. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısında görülen vakuolizasyon. gd: gonad, *: vakuolizasyon, Toluidin mavisi boyama, x100.



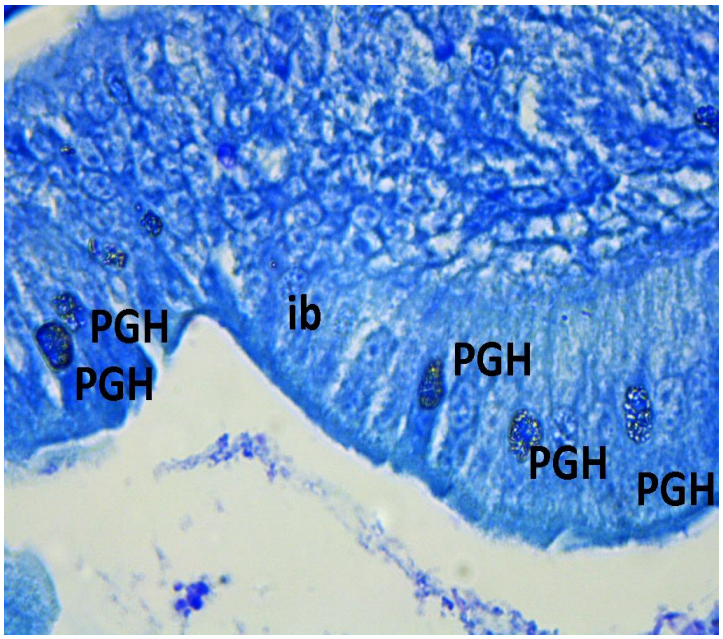
Şekil 4.245. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 37. günde gonad yapısı. gd: gonad, doc: dejenere oosit, poc: perinükleolar oosit, PAS boyama, x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 42. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.246.) ve ince barsakta (Şekil 4.247.) gonadal bölgeye doğru göç etmekte olan primordiyal germ hücreleri görüntülendi. Pelvik yüzgeçte 1 mg/L LAS uygulaması sonucu göç yolundan ayrılan primordiyal germ hücreleri tespit edildi (Şekil 4.248.).

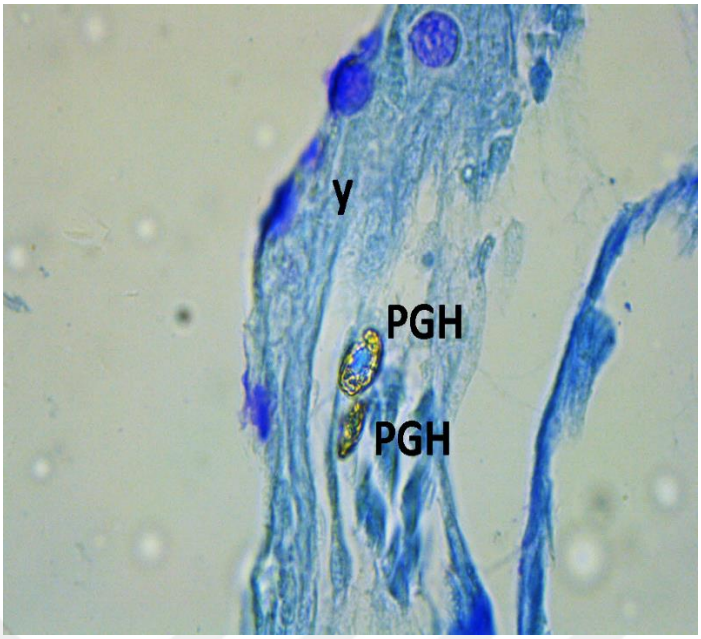
Gonad yapısı incelendiğinde goniyal hücreler, tip1 ve tip 2 germ hücreleri ve perinükleolar oositler görüldü. Bunun yanısıra çok sayıda rezidual cisimcik gözlendi (Şekil 4.249.).



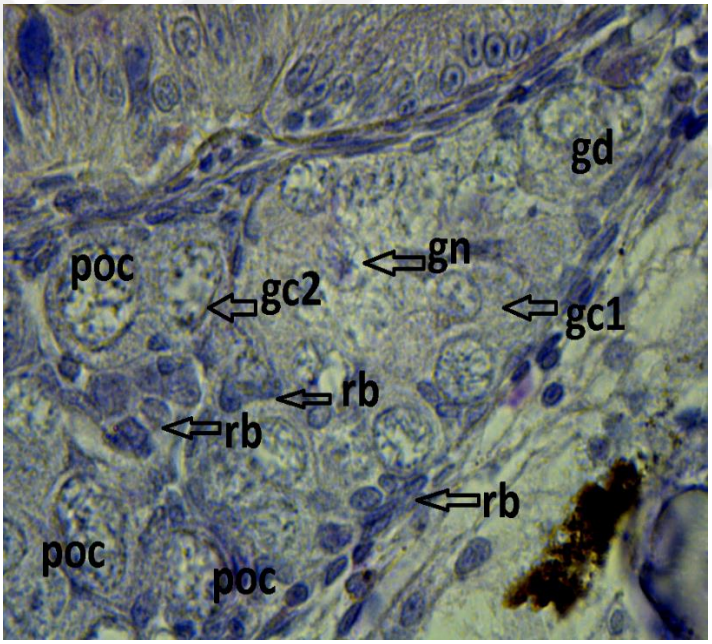
Şekil 4.246. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama x100.



Şekil 4.247. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, Toluidin mavisi boyama x100.

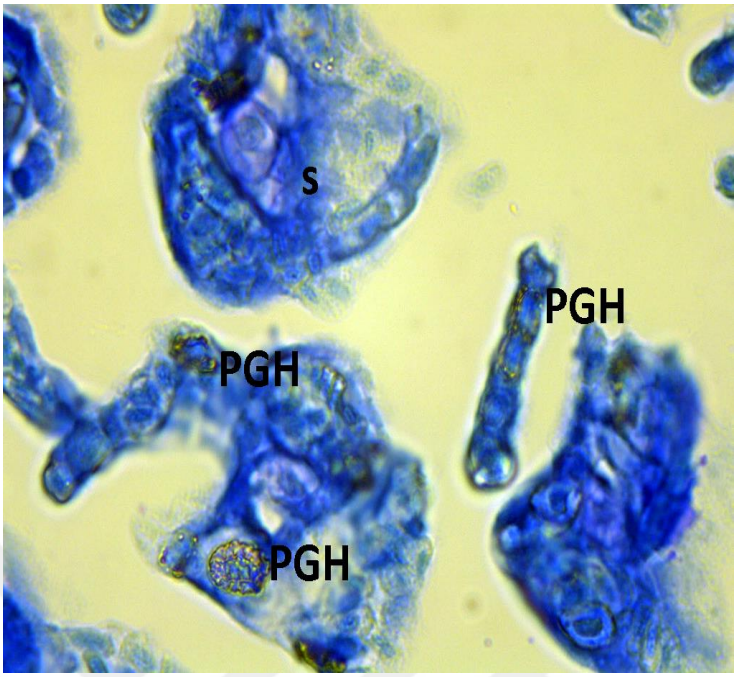


Şekil 4.248. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde pektoral yüzgeçte görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, y: yüzgeç, Toluidin mavisi boyama x100.

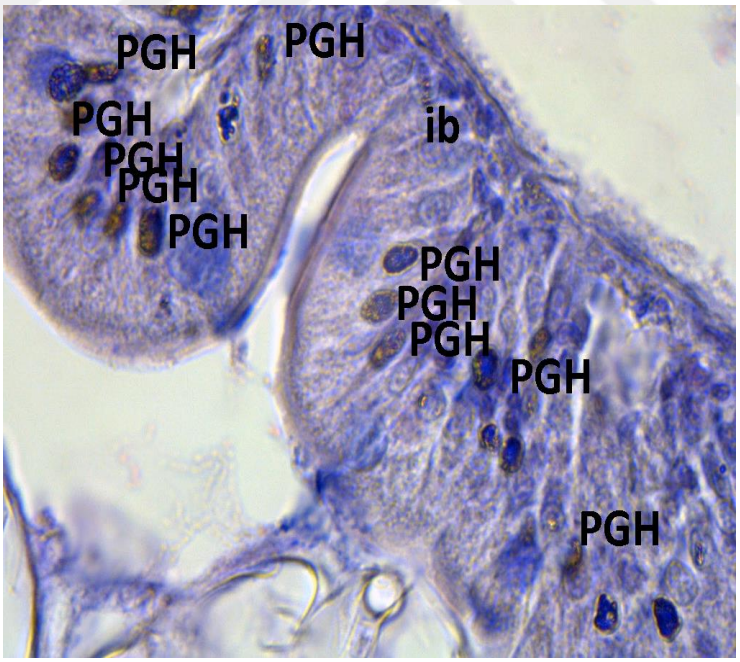


Şekil 4.249. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 42. günde gonad yapısı. poc: perinükleolar oosit, gn: goniyal hücre, gc1: tip 1 germ hücresi, gc2: tip 2 germ hücresi, rb: rezidual cisimcik, gd: gonad, PAS boyama x100.

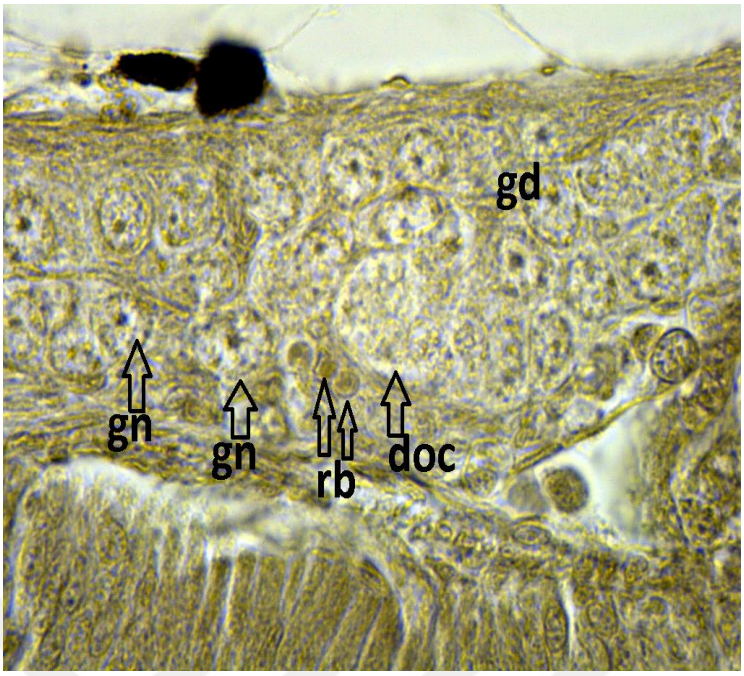
1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 47. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.250.), kalpte ve ince barsakta (Şekil 4.251.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde pek çok goniyal hücrenin ve rezidual cisimciklerin yanı sıra dejenere oositler görüldü (Şekil 4.252.).



Şekil 4.250. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama x100.

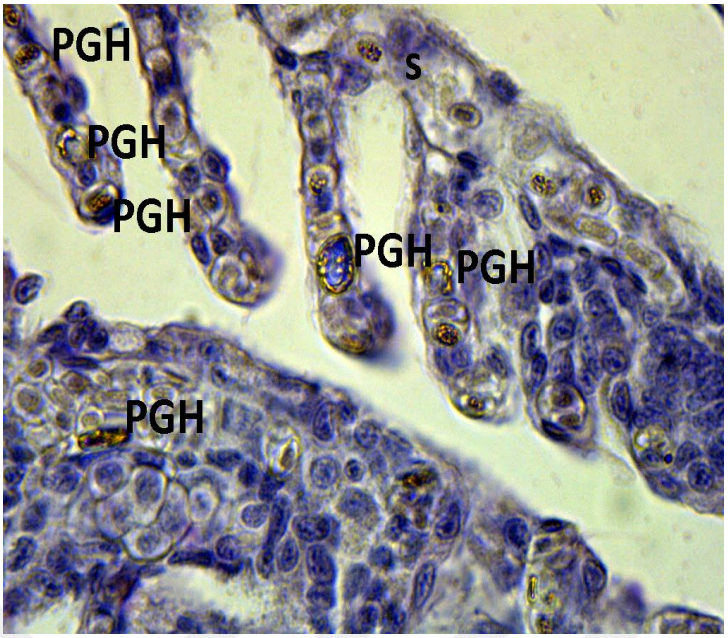


Şekil 4.251. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama x100.

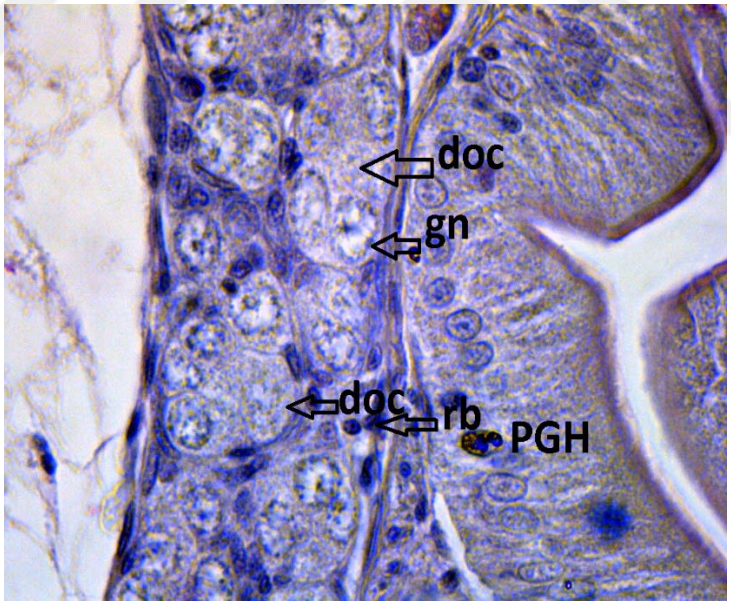


Şekil 4.252. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 47. günde gonad yapısı, gn: goniyal hücre, rb: rezidual cisimcik, gd: gonad, Alkalin Fosfataz boyama x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 52. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.253.) ve ince barsakta primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Yapılan PAS boyaması sonucunda bu hücrelerin amorf ve sitoplazmalarında glikojen granülleri içeren hücreler olduğu görüldü. Gonad yapısı incelendiğinde ve kontrol grubu ile kıyaslandığında 1 mg/L LAS uygulamasının gonadal farklılaşmayı engellediği tespit edildi. Gonad yapısında goniyal hücreler, rezidual cisimcikler ve dejenere oositler görüntülendi (Şekil 4.254.).



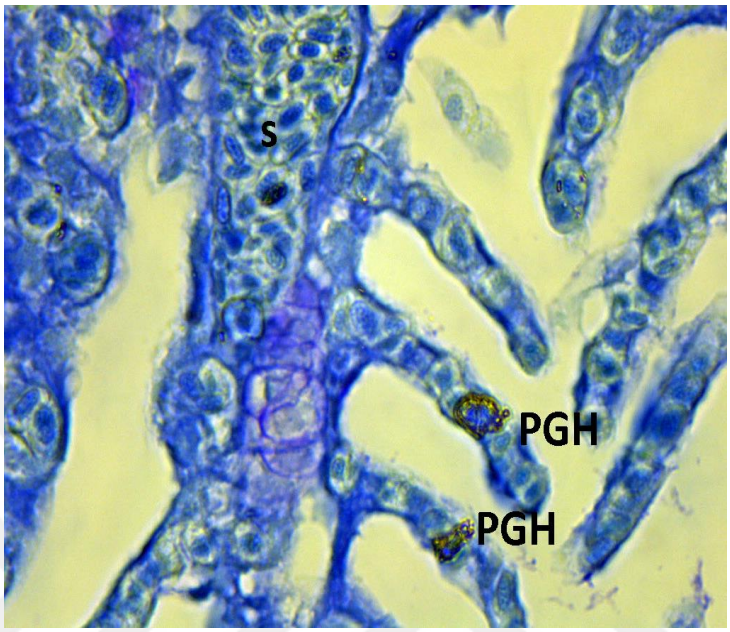
Şekil 4.253. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, PAS boyama x100.



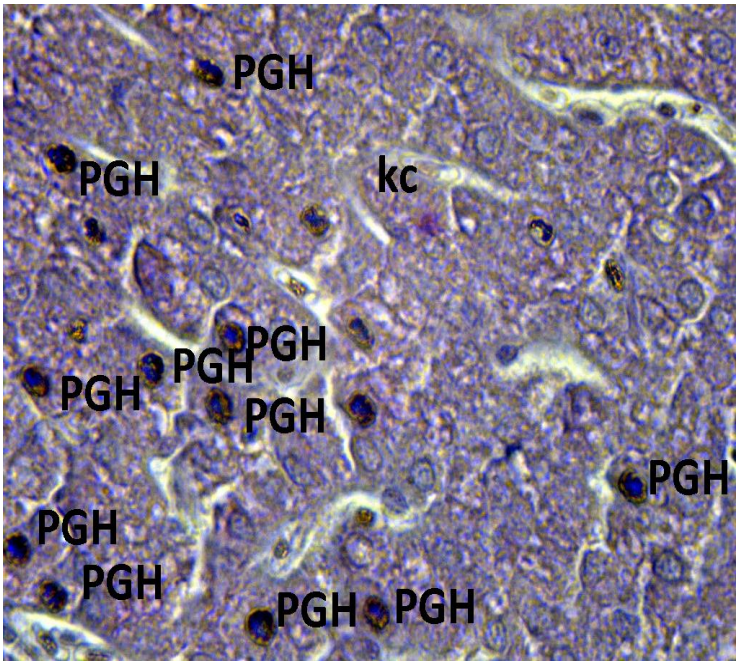
Şekil 4.254. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 52. günde gonad yapısı, PGH: primordiyal germ hücresi, gn: goniyal hücre, rb: rezidual cisimcik, doc: dejenere oosit, PAS boyama x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 57. gününde, solungaç lamellerinde (Şekil 4.255.) ve karaciğerde (Şekil 4.256.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde, farklılaşmanın sadece goniyal hücreler ile sınırlı kaldığı görüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 1 mg/L LAS uygulamasının gonadal

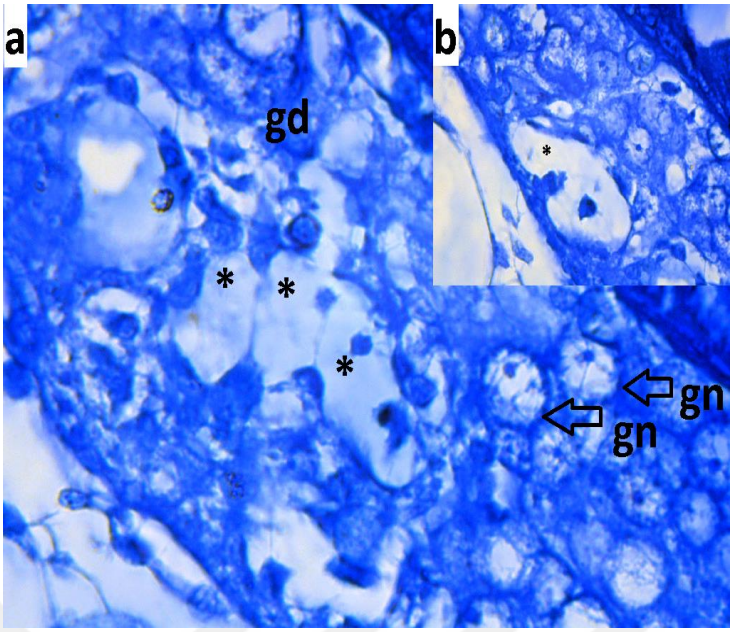
farklılaşmaya ket vurduğu gözlendi. Goniyal hücrelerin yapısında vakuolizasyon görüldü. LAS uygulaması yapılan diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ise doz artışına bağlı olarak gonadal hücrelerdeki hasarın arttığı tespit edildi (Şekil 4.257.).



Şekil 4.255. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde solungaçta görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, s: solungaç, Toluidin mavisi boyama x100.

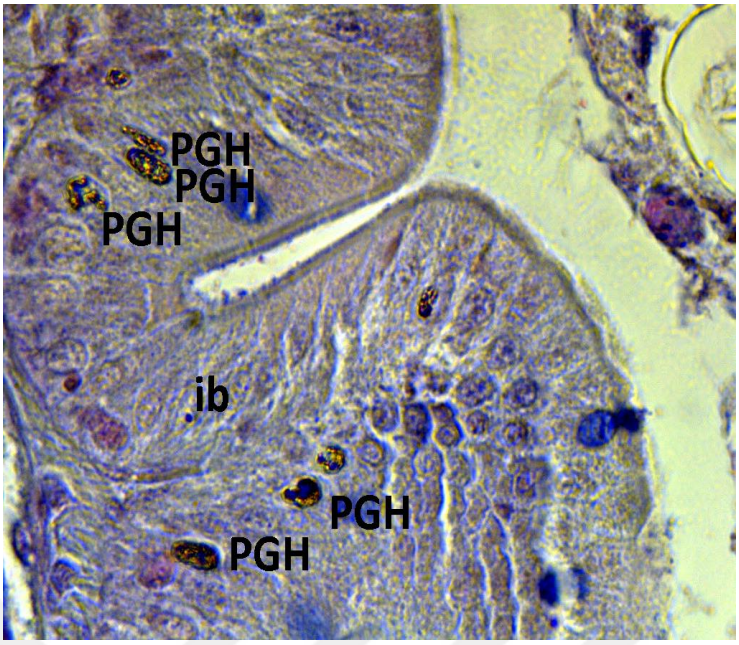


Şekil 4.256. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde karaciğerde görülen primordiyal germ hücreleri. PGH: primordiyal germ hücresi, kc: karaciğer, Best Carmin boyama x100.

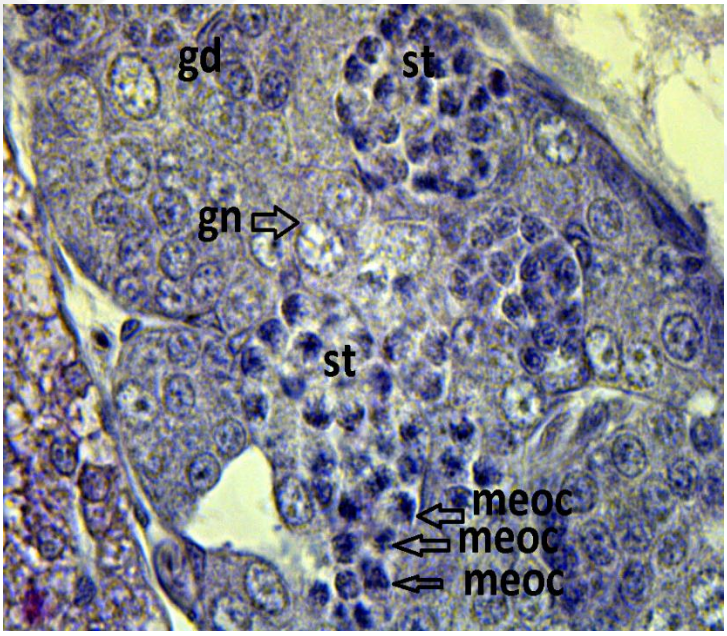


Şekil 4.257. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 57. günde gonad yapısı, gn: goniyal hücre, *: vakuolizasyon, Toluidin mavisi boyama a,b-x100.

1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grupta gelişimin 60. gününde, solungaç lamellerinde, karaciğerde ve ince barsakta (Şekil 4.258.) primordiyal germ hücreleri tespit edildi. Gonad yapısı incelendiğinde ise mayoz bölünme geçirmekte olan pek çok hücre görüntülendi. Bu hücrelerin seminifer tübül benzeri yapılar içerisinde konumlandığı görüldü. Kontrol grubu ile kıyaslandığında gelişmiş bir gonad yapısı izlenemedi (Şekil 4.259.).



Şekil 4.258. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde ince barsakta görülen primordiyal germ hücreleri, PGH: primordiyal germ hücresi, ib: ince barsak, PAS boyama, x100.



Şekil 4.259. 1 mg/L LAS uygulaması yapılmış grup, 60. günde gonad yapısı. gd: gonad, gn: goniyal hücre, meoc: mayoz bölünme geçiren hücreler, st: seminifer tübül, PAS boyama, x100.

BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada dünyada en çok kullanılan yüzey aktif maddelerden biri olan LAS'ın zebra balığı embiyo ve larvalarında gelişimin ilk döneminden itibaren embriyonik kök hücreden gonad oluşum aşamasına kadar oluşturduğu toksik etkiler histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir. 24, 48, 96 ve 120 saatlik LC50 konsantrasyonları belirlendikten sonra, zebra balığı embriyolarına gelişimin 4. saatinde 0,25, 0,5 ve 1 mg/L'lik dozlarda LAS uygulaması yapılmıştır. LAS uygulamasının akut toksisitesinin incelenmesi amacıyla zebra balığı embriyolarının gelişimi 5 gün boyunca izlenmiştir. Deney gruplarında, omurgada ve kuyrukta eğrilme, perikardiyal ödem, vitellus kesesi ödemi, koryondan çıkma süresinde gecikme, boy uzunluğunda kısalma gibi gelişim anomalileri tespit edilmiştir. 1 günlük zebra balığı embriyolarına akridin turuncusu boyaması yapılmış ve TUNEL analizi uygulanmıştır. Akridin turuncusu boyaması sonucunda deney grubundaki embriyoların vitellus kesesinde çok sayıda ölü hücre tespit edilmiştir. TUNEL analizi sonucunda ise LAS uygulamasının zebra balığı embriyolarında apoptoza sebep olduğu görülmüştür. Gonad oluşumu için kilit rol oynayan primordiyal germ hücrelerinin izlediği yol 60 gün boyunca PAS, Best Carmin, Toluidin mavisi ve Alkalin fosfataz gibi özel boyama yöntemleri ile izlenmiştir. Deney gruplarında ektopik bölgelerde, göç yolundan ayrılmış primordiyal germ hücreleri saptanmıştır. Gonad yapısı incelendiğinde, LAS uygulamasının zebra balığında gonad farklılaşmasını geciktirdiği tespit edilmiştir.

Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinden itibaren morfolojik olarak somatik hücrelerde ışık mikroskobu altında izlenebilirler. Bu hücreler, nükleuslarının morfolojisi açısından da diğer hücrelerden farklıdırlar. Büyük boyutlu ve iri nükleuslu olan bu hücreler, oval hücre şekilleri ile yuvarlak şekilli ve küçük boyutlu somatik hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Nagai ve ark. (2001) zebra balıklarında primordiyal germ hücrelerinin histolojisini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada

primordiyal germ hücrelerini histolojik kesitlerde gastrulasyon aşamasından itibaren tespit etmişlerdir. Bu hücrelerin sitoplazmalarında eozinofilik granüllerin bulunduğunu ve bu granüllerin çekirdeğin etrafında yer aldığını görüntülemişlerdir. Knaut ve ark. (2000)'nın yaptıkları elektron mikroskopi çalışmasında ise primordiyal germ hücrelerinin sitoplazmasında *vasa* mRNA içerdiklerini ve primordiyal germ hücrelerinin farklılaşmasında anasal faktörlerin rol oynadığını tespit etmişlerdir. Zebra balığının yanı sıra, *Xenopus laevis* (Ressom ve Dixon, 1988), *Caenorhabditis elegans* (Subramaniam ve Seydoux, 1999), *Drosophila melanogaster* (Koprunner ve ark., 2001) gibi model organizmalarda da primordiyal germ hücreleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Kemikli balıklarda primordiyal germ hücreleri ile ilgili ışık ve elektron mikroskopi çalışmaları 1950'li yıllardan beri yapılmaktadır (Johnston, 1951; Gamo, 1961).

Çeşitli kimyasalların zebra balıklarında primordiyal germ hücrelerinin göçüne etkilerinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma vardır. Koç (2008)'un yaptığı çalışmada yaygın kullanılan pestisitlerden biri olan deltamethrinin zebra balıklarında primordiyal germ hücrelerinin morfolojisine ve göçüne olan etkileri incelenmiştir. Farklı dozlarda deltamethrin, embriyoların yaşama ortamına verilmiş ve 15 gün süresince primordiyal germ hücreleri H&E, PAS, Toluidin mavisi ve Alkalin Fosfataz boyamaları yapılarak histolojik olarak incelenmiştir. Deltamethrin uygulaması sonucunda primordiyal germ hücrelerinin morfolojilerinde bozulma ve boyutunda küçülme tespit edilmiştir. Ayrıca primordiyal germ hücrelerinin sayısında azalma, mitokondri ve diğer organellerde bozulma izlenmiştir. Gelişimin ilerleyen günlerinde deney gruplarına ait primordiyal germ hücrelerinde nuage materyali izlenememiştir. Akbulut ve ark. (2013)'nın yaptığı diğer bir çalışmada ise önemli endokrin bozuculardan biri olan Bisfenol A'nın zebra balığı embriyo ve larvalarında primordiyal germ hücrelerine olan etkisi histolojik yöntemler ile incelenmiştir. BPA uygulamasının zebra balığı embriyo ve larvalarında primordiyal germ hücrelerinin göçünü etkilediği tespit edilmiştir. Whole mount in situ hibridizasyon analizleri sonucunda ektopik bölgelerde primordiyal germ hücreleri tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, histolojik çalışmalarla da doğrulanmıştır. İncelenen histolojik kesitlerde ektopik bölgelerde göç yolundan sapmış primordiyal germ hücreleri tespit edilmiştir. Ayrıca BPA uygulamasının primordiyal germ hücre

sayısının artışına sebep olduğu görülmüştür. Yapılan akridin turuncusu boyaması sonucunda, BPA uygulamasının hücre ölümünde artışa sebep olmadığı tespit edilmiştir. Tez çalışması kapsamında BPA uygulamasına benzer şekilde LAS maruziyetinin zebra balığı embriyo ve larvalarında primordiyal germ hücrelerinin ektopik bölgelere göçünü indüklediği görülmüştür. Ektopik bölgelerde primordiyal germ hücrelerinin varlığı histolojik kesitlerde görüntülenmiştir. Bu bağlamda LAS uygulamasının da BPA gibi primordiyal germ hücrelerinin göç mekanizmasını etkilediği tespit edilmiştir. Yapılan akridin turuncusu boyaması ve TUNEL analizleri sonucunda LAS uygulamasının apoptoza sebep olduğu görülmüştür. Hücre ölümüne olan etkileri kıyaslandığında LAS'ın BPA'dan farklı bir etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Willey ve Krone (2001)'un yaptığı çalışmada endosülfan ve nonilfenolün zebra balığı embriyo ve prelarvalarında primordiyal germ hücrelerinin dağılımına ve göçüne olan etkisi araştırılmıştır. Embriyolara gelişimin 2. saatinde endosülfan ve nonilfenol uygulaması yapılmıştır. 10^{-7} M'dan yüksek konsantrasyonlarda hem nonilfenol hem de endosülfan uygulanan gruplarda gelişim anomalileri (omurga yapısında eğirlilik, ödem oluşumu, baş boyutunda küçülme) ve davranışsal bozukluklar (yuvarlak hareketlerle yüzme ve yavaş hareket etme) gözlenmiştir. 24 saatlik zebra balığı embriyolarına yapılan whole mount in situ hibridizasyon deneyleri sonucunda nonilfenol ve endosülfan uygulaması yapılmış embriyolarda primordiyal germ hücrelerinin göç edebildikleri tespit edilmiştir. Endosülfan uygulaması sonucunda 5., 6., ve 9. somitlerde primordiyal germ hücre sayısı azalırken, 7. ve 8. somitlerde primordiyal germ hücre sayısının arttığı görülmüştür. Nonilfenol uygulamasında ise 6. 7. ve 9. somitlerde primordiyal germ hücre sayısında azalma izlenirken, 8. somitte bulunan primordiyal germ hücre sayısında artış görülmüştür. 24 saatlik embriyolarda en fazla sayıda primordiyal germ hücresi 7. somitte tespit edilmiştir. Sonuç olarak, endosülfan ve nonilfenol uygulamasının zebra balığı embriyolarında gonad morfolojisinin oluşumunda etkili olan primordiyal germ hücrelerinin dağılımında değişime sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, gerek gelişim anomalisine gerekse primordiyal germ hücre dağılımının değişimine sebep olması açısından LAS'ın endosülfan ve nonilfenol ile benzer etki gösterdiği söylenebilir. Çalışmamızda,

Willey ve Krone (2001)'un çalışmasından farklı olarak primordiyal germ hücrelerinin göçü uzun süre boyunca takip edilmiştir. LAS uygulaması sonucunda, primordiyal germ hücrelerinin göç yolundan ayrıldıkları ve hedef organ yerine farklı bölgelere göç ettikleri tespit edilmiştir.

Yapılan literatür taraması sonucunda, sürfaktanların balıklarda gonad oluşumuna etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır. Buna karşın, endokrin bozucu ya da pestisit gibi maddelerin gonad farklılaşmasına etkisi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Corvi ve ark. (2012), bir herbisit türü olan atrazin (ATZ)'in kronik maruziyetinin zebra balığında cinsiyet gelişimine olan etkisini araştırmışlardır. 0.1, 1, 10 µM ATZ ve 1 nM 17α-estradiol (E2) uygulaması sonucunda balıkların cinsiyetleri ve gonad gelişimleri incelenmiştir. E2 uygulaması yapılan balıklarda kontrol grubuna kıyasla gonad yapısının ovaryum yönünde farklılaştığı tespit edilmiştir. ATZ uygulamasının ise cinsiyet gelişimi üzerinde bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Tanka ve Grizzle (2002)'ın yaptıkları çalışmada önemli bir endokrin bozucu olan nonilfenolün (NP), hermafrodit bir balık olan *Rivulus marmoratus*'da gonad farklılaşmasına olan etkisi incelenmiştir. 150 ve 300 µg/L NP uygulamasının oogenezi inhibe ettiği tespit edilmiştir. 17α-etinilestradiol (EE) ve NP'un zebra balıklarında gametogeneze olan etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada larvalara gelişimin 2. gününden 60. güne kadar olan süre boyunca NP (≥100 µg/L) ve EE (≥1 ng/L) uygulaması yapılmıştır (Weber ve ark., 2003.). NP ve EE maruziyetinin hem dişi hem de erkeklerde gametogenezi baskıladığı görülmüştür Ovaryum yapısında sadece oogonyum ve previtellojenik oositler tespit edilebilmiştir. Seminifer tübüllerde ise NP ve EE uygulamaları sonucunda spermatogonyum sayısı fazla iken, sperm oluşumu gözlenmemiştir. Tez çalışması kapsamında ise LAS uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla zebra balıklarında gametogeneze ket vurduğu ve cinsiyet farklılaşmasını geciktirdiği sonucuna varılmıştır.

Wang ve ark. (2015), anyonik [sodyum dodesilsülfat (SDS)], katyonik [dodesil metil benzil amonyum klorid (1227)] ve noniyonik [yağ alkol polioksietilen eter (AEO)] sürfaktanların zebra balığı embriyo ve larvaları üzerindeki akut toksik etkilerini araştırmışlardır. 1 µg/mL'lik dozlardaki 1227 ve AEO'nin larvaların hareket

aktivitelerine zarar verdiği, bunun yanı sıra SDS'in ise toksik etkisinin bulunmadığını saptamışlardır. AEO uygulamasının SDS ve 1227 ile kıyaslandığında, embriyolarda baş ve göz boyutunda küçülmeye yol açtığını tespit etmiş ve bu gruptaki embriyoların diğer gruplar ile kıyaslandığında boylarının daha kısa olduğunu gözlemişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında LAS uygulaması sonucunda doz artışına bağlı olarak embriyo boy uzunluğunda gelişim geriliği tespit edilmiştir. Bu açıdan LAS ve AEO'nun embriyoların boylarının uzamasını önlemesi açısından benzer bir etki gösterdikleri söylenebilir.

Li ve ark. (2017)'nın yaptığı diğer bir çalışmada 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D)'nin zebra balığında gelişim toksisitesi araştırılmıştır. Embriyolara 25, 40, 50, 60, 75 ve 100 mg/L'lik 2,4-D uygulaması yapılmıştır. 25 mg/L'lik dozda kalp gelişimini sağlayan genlerin (*vmhc*, *amhc*, *hand2*, *vegf*, *gata1*) ekspresyonunda artış ve oksidatif stres genlerinin (*cat* ve *gpx1a*) ekspresyonunda azalma tespit etmişlerdir. Embriyolarda en çok görülen gelişim anomalisinin perikardiyal ödem olduğu belirtilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney gruplarında boy uzunluğunda kısalma, koryondan çıkma süresinde artış ve ölüm oranında artış gibi etkiler görmüşlerdir. Benzer gelişim anomalileri LAS uygulaması sonucunda da görülmüştür.

Başka pestisitlerin de zebra balığı gelişimine olan etkileri çalışılmıştır. Shi ve ark. (2008), perflorooktansülfonat (PFOS)'ın zebra balığı embriyolarında gelişim toksisitesi ve gen ekspresyonuna olan etkilerini araştırmışlardır. Embriyolara 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L ve 5 mg/L'lik dozlarda PFOS uygulaması yapılmıştır. Deney gruplarında koryondan çıkış süresinde artış, embriyoların koryondan çıkma oranında azalma, epiboli deformiteleri (bozuklukları), hipopigmentasyon (pigmentasyonda azalma), vitellus kesesi ödemi, kuyruk ve kalp yapısında bozulmalar, omurga eğriliği ve boy uzunluğunda kısalma tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan akridin turuncusu boyaması ve TUNEL analizleri sonucunda PFOS uygulamasının apoptozu artırdığını görmüşlerdir. *Bax* ve *p53* genlerinin ekspresyonunda artış tespit etmişlerdir. Shi ve ark. (2008)'nın tespit ettiği koryondan çıkış süresinde artış, embriyoların koryondan çıkma oranında azalma, vitellus kesesi ödemi, omurga eğriliği ve boy

uzunluğunda kısalma ve embriyolarda apoptoz artışı gibi bulgular, bizim bulgularımıza benzer niteliktedir.

Deng ve ark. (2009)'nın yaptığı çalışmada bromlu bir bileşik olan ve yangın geciktirici olarak kullanılan hekzabromosiklododekan (HBCD)'ın zebra balığı embriyolarında gelişim toksisitesine ve apoptoza olan etkileri incelenmiştir. Embriyolara, gelişimin 4. saatinden itibaren 4 günlük süre boyunca çeşitli dozlarda HBCD uygulaması yapılmıştır. Düşük dozlarda (0,05, 0,1, 0,5 ve 1 mg/L) gelişim anomalileri görülürken, yüksek dozlarda embriyoların öldüğü tespit edilmiştir. Akridin turuncusu boyaması sonucunda, deney gruplarındaki embriyoların özellikle kalp bölgesinde ölü hücreler tespit edilmiştir. Buna ek olarak, yapılan RT-PCR analizleri sonucunda, *p53*, *Puma*, *Apaf-1*, *kaspaz-9* ve *kaspaz-3* gibi apoptotik genlerin ekspresyonunda artış görülürken, *Mdm2* (*p53* antagonisti) ve *Bcl-2* (*Bax* inhibitorü) gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunda azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak HBCD uygulamasının zebra balıklarında gelişim anomalilerini ve apoptozu artırdığı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında, LAS uygulaması sonucunda da, omurga yapısında eğrilik, boy uzunluğunda kısalma, perikardiyal ödem, vitellus kesesi ödemi, kuyruk yapısında eğrilme ve koryondan çıkma oranında azalma gibi gelişim anomalileri tespit edilmiştir. Yapılan akridin turuncusu boyaması ve TUNEL analizleri sonucunda, kontrol grubuna kıyasla deney grubunda apoptotik hücrelerde artış görülmüştür.

Wu ve ark. (2016), tetrabromobisfenol A (TBBPA)'nın zebra balığı embriyo ve larvalarında toksik etkilerini incelemişlerdir. Zebra balığı embriyolarına, gelişimin 4. saatinde çeşitli konsantrasyonlarda (0,10, 0,40, 0,70 ve 1.00 mg/L) TBBPA uygulaması yapılmıştır. Doz artışına bağlı olarak koryondan çıkış ve yaşama oranında düşme, larvaların boy uzunluğunda azalma ve anomali (perikardiyal ödem, kuyrukta eğrilik vb.) oluşumunda artış tespit edilmiştir. Sonuçlar, tez çalışması sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Bu bağlamda, gelişim toksisitesi açısından LAS uygulamasının zebra balığı embriyo ve larvalarında TBBPA ile benzer bir toksik etkiye sahip olduğu söylenebilir. LAS uygulaması da zebra balığı embriyo ve larvalarında koryondan çıkışta gecikme, yaşama oranında düşme, anomali düzeyinde artış ve larvaların boy uzunluğunda azalmaya benzer şekilde sebep olmuştur. Buna karşın, Wu

ve ark. (2016), 0,1 mg/L'lik grupta SOD ve GPx aktivitesinde bir değişim gözlemezlerken, diğer doz gruplarında kontrol grubuna kıyasla belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. CAT aktivitesinde ise, tüm gruplarda düşüş görülmüştür. Bizim çalışmamızda ise LAS uygulamasının zebra balığı larvalarında oksidatif stres parametrelerinde kontrol grubuna kıyasla fark görülmemiştir. Bu bağlamda, LAS ve TBBPA'nın oksidatif stres açısından farklı şekilde etki gösterdiği görülmüştür. Wu ve ark. (2016)'nın çalışmasında, TBBPA uygulaması sonucunda, akridin turuncusu boyaması yapılmış, beyin, kalp ve kuyrukta ölü hücreler gözlenmiştir. Tez çalışması kapsamında ise LAS uygulaması sonucunda akridin turuncusu boyaması yapılarak vitellus kesesinde ölü hücrelerin varlığı tespit edilmiştir.

Wu ve ark. (2011), bisfenol A(BPA), nonilfenol (NP) ve bu iki endokrin bozucunun karşımının zebra balığı embriyolarında oksidatif strese olan etkilerini araştırmışlardır. Embriyolar, gelişimin 4. saatinden, 7 günlük aşamaya kadar bu kimyasallara maruz bırakılmıştır. 7. gün sonunda embriyolar homojenize edilerek, total glutatyon, GSH, GSSH, SOD, Gpx, GST, CAT, MDA ve alkalin fosfataz seviyeleri ölçülmüştür. Çalışma sonucunda BPA, NP, BPA+NP uygulanan gruplarda GSH, GSSH, Gpx, GST, CAT, SOD ve alkalin fosfataz seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla düşüş, MDA seviyesinde ise artış tespit etmişlerdir. BPA+NP grubundaki etkinin, BPA ve NP gruplarında ayrı ayrı görülen etkiden daha kuvvetli olduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla iki ayrı toksik maddenin, biraraya geldiğinde daha kuvvetli bir ko-toksisite yarattığı söylenebilir. Bizim çalışmamızda LAS uygulaması benzer şekilde gelişimin 4. saatinden, gelişimin 7. gününe kadar yapılmıştır. Fakat kontrol grubuna kıyasla oksidatif stres parametrelerinde ve antioksidan enzim değerlerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Bu durum, embriyolara düşük dozlarda LAS uygulandığı için olabilir. Deney planlaması yapılırken, zebra balıklarının gonad gelişimini net bir şekilde gözlemek adına balıkların en az 2 ay yaşayabilmesini sağlayacak düzeyde LAS konsantrasyonları seçilmiş, dolayısıyla en yüksek doz 120 saatlik LC_{50} konsantrasyonunun yarısı olacak şekilde belirlenmiştir.

Du ve ark. (2017) yaptığı çalışmada, perflorooktan sülfonat (PFOS) ve çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerinin zebra balığı embriyolarında oksidatif stres ve apoptoza olan

etkileri incelenmiştir. Embriyolara 96 saatlik gelişim süresi boyunca PFOS (0,4, 0,8 ve 1,6 mg/L), ZnO nanopartikülü (12,5, 25, 50 mg/L) ve PFOS + ZnO nanopartikülü (0,4+12,5, 0,8+25 ve 1,6+50 mg/l) uygulaması yapılmıştır. 96 saatlik maruziyet süresi sonunda, SOD, CAT, Gpx ve MDA değerleri ölçülmüştür. Deney gruplarında Gpx ve MDA seviyelerinde artış tespit edilmiştir. PFOS+ZnO grubunda, *Bax, p53, kaspaz-3* ve *kaspaz-9* gibi apoptotik genlerin ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Yine aynı grupta *Cat*, GSH peroksidaz 1 (*Gpx1a*) ve superoksit dismutaz 1 (*Sod1*) genlerinin ekspresyonunda ise azalma görülmüştür. Çalışma sonucunda, PFOS+ZnO'nun birlikte yarattığı toksik etkinin PFOS ve ZnO nanopartikülünün ayrı ayrı yarattığı toksik etkiden daha fazla olduğu kanısına varılmıştır. Tez kapsamında benzer şekilde LAS uygulamasının apoptoza sebep olduğu yapılan TUNEL analizi sonucunda tespit edilmiştir. Fakat LAS uygulamasının oksidatif stres parametrelerinde kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişime sebep olmadığı görülmüştür.

LAS'ın toksisitesi başka balık türlerinde de çalışılmıştır. Koç ve Güven (2002), LAS'ın alabalıkta (*Oncorhynchus mykiss*) toksik etkisini araştırmışlardır. LAS'ın solungaç, karaciğer, mide ve karaciğerdeki birikimini ise azur A ve toluidin mavisi boyaları kullanarak metakromatik yöntemlerle tespit etmişlerdir. Çalışma kapsamında kümülatif (12,5 mg/L, tek doz) ve kademeli (günlük 4,5 mg/L LAS) olmak üzere 2 deney grubu ve 1 kontrol grubu oluşturmuşlardır. Bu çalışma sonucunda LAS'ın çeşitli organlar tarafından emilip balık vücudunda dağıldığını gözlemişlerdir. Dokulardan alınan kesitler incelendiğinde, solungaç, mide ve kalp gibi çeşitli organlarda LAS birikimine rastlamışlardır. LAS birikimi solungaç > mide > kalp şeklinde tespit edilmiştir. Varsha ve ark. (2011) yaptığı çalışmada, LAS uygulamasının *Puntius ticto*'nun solungaçlarındaki histopatolojik etkileri incelenmiştir. Balıklara 24, 48, 72 ve 96 saatlik periyotlarla 20-28 mg/L LAS uygulaması yapılmıştır. Solungaç dokuları incelendiğinde, solungaç lamellerinin epitel dokusunda histolojik değişimler, kapillerde kan birikimi, mukoz hücrelerinde artış tespit etmişlerdir. Anyonik yüzey aktif maddelerden SDS ve LAS'ın *Sparus aurata*'nın spermlerinin dölleme kapasitesine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, balıklardan elde edilen spermler 60 dakika boyunca çeşitli konsantrasyonlarda (0,3 mg/L, 0,6 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L ve 6 mg/L) SDS ve LAS'a maruz bırakılmıştır (Rosety ve ark., 2001). Daha sonra, 20

dakika boyunca sperm ve yumurtalar aynı ortamda tutulmuş ve döllenmiş ve döllenmemiş yumurtaların oranları not edilmiştir. Çalışma sonucunda her iki yüzey aktif madde maruziyetinde de doz artışına bağlı olarak spermlerin döllenme kapasitesinin azaldığı tespit edilmiştir.

Deterjanlar günlük hayatta en çok kullanılan kimyasallardır. Bu kimysalların yaygın kullanımı sonucunda ekosisteme ciddi oranda deterjan salınımı olmaktadır. Bu kirlilikten, sucul canlılar da ciddi oranda etkilenmektedir. Deterjanların çok düşük dozlarının bile balıklarda olumsuz etkilere sebep olduğu bu çalışma ile ispatlanmıştır. Çalışmamızda, LAS uygulamasının primordiyal germ hücrelerinin göç yolundan ayrılmalarına sebep olduğu, gonad gelişimini geciktirdiği, apoptoza ve gelişim anomalilerine sebep olduğu tespit edilmiştir. Primordiyal germ hücrelerinin göçünde meydana gelen hasar ve değişiklikler, gonad oluşumunu yakından etkilemektedir. Kontrol grubundaki balıkların gonad yapıları incelendiğinde ovaryum ya da testis yönünde farklılaşma gözlenirken, LAS uygulaması gonad gelişimini yavaşlattığı ve gonad yapısında histopatolojik değişimlere sebep olduğu için deney gruplarında kesin bir cinsiyet teşhisi yapılamamıştır. Bunun uzun süreli etkisi, deterjan maruziyetinin balıkların üremesine ket vurmasıdır. Dolayısıyla gereksiz yere deterjan kullanımından mümkün olduğunca kaçınılmalı ve çevreye deterjan salınımı minimuma indirilmelidir.

KAYNAKLAR

Abozaid, H. Wessels, S., Horstgen-Schwark, G. 2011. Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish (*Danio rerio*). Sex Dev. 5: 259–265.

Abozaid, H. Wessels, S., Horstgen-Schwark, G. 2012. Elevated temperature applied during gonadal transformation leads to male bias in zebrafish (*Danio rerio*). Sex Dev. 6: 201–209.

Adams, J.M. Cory S. 2001. Life or death decisions by the Bcl-2 family. Trends Biochem. Sci., 26: 61-6.

Adrain, C. Martin, S.J. 2001. The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. Trends Biochem. Sci., 26: 390-7.

Adu, R.O. Thomsen, J.P. 2011. Improving Production of Zebra Fish Embryos in the Lab. J. Environ. Prot., 2: 1360-1363.

Aebi, H. 1974. Catalase in vitro. İçinde: Methods of Enzymatic Analysis. 121-126.

Agarwal, C., Mathur, A.K., Gupta, B.N., Singh A., Shanker R.1990. Synthetic detergents induced biochemical and histological changes in skin of guinea pigs. Z. Gesamte Hyg., 36: 316-318.

Akbulut, C. Kızıl, Ç., Yön, N.D. 2013. Effects of Low Doses of Bisphenol A on Primordial Germ Cells in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos and Larvae. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg., 19 (4): 647-653.

Akbulut, C. Öztürk, B., Genç, H., Zengin, M., Yön, N.D. 2017. Developmental Toxicity of (4S)-2- (4-hydroxy-3-methoxyphenyl) thiazolidine-4-carboxylic acid in Zebrafish (*Danio rerio*). Braz. Arch. Biol. Technol., 60: e17160547.

Akkuş, İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları.

Akşit, H. Bildik, A. 2008. Apoptozis. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg., 19(1): 55-63.

Akyüz, M. Roberts, D.J. 2002. Determination of linear alkylbenzene sulphonates and their biodegradation intermediates by isocratic RP-HPLC. Turk. J. Chem., 26: 669-679.

Andre, J. Rouiller, C.C. 1957. L'ultrastructure de la membrane nucleaire des ovocytes de l'araignee (Tegeneraria domestica Clark). İçinde: Proceedings of the European Conference on Electron Microscopy, Stockholm. Academic Press, New York. 162-164.

Atlı, K. Bozcuk, N.A. 2002. Telomer ve hücresel yaşlanma. Turk.J. Geriatr., 5 (3): 111-114.

Avdesh A. Chen, M., Martin-Iverson, M.T., Mondal, A., Ong,D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D.M., Verdile,G., Martins, R.N. 2012. Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. J. Vis. Exp., 69: 4196.

Baines, C.P. 2010. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. Front Physiol., 1: 156.

Bakırel, T. Keles, O., Karatas, S., Ozcan, M., Turkmen G., Candan A. 2005. Effect of linear alkyl benzene sulphonate (LAS) on non-specific defence mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 71: 175 -181.

Bakkers, J. 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. Cardiovasc Res., 91(2):279-88.

Bambino, K. Chu, J. 2017. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. Curr Top Dev Biol. 124:331-367.

Bartfai, R. Orban, L. 2003. The vasa locus in zebrafish: multiple RGG boxes from duplications. DNA Cell Biol. 22: 47–54.

Baser, H. Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichmann, F.M., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E. 2005. Transition From Non-motile Behaviour to Directed Migration During Early PGC Development in Zebrafish. J. Cell Sci., 118: 4027-4038.

Batıgöç, Ç. 2010. Yüzey aktif maddelerin etkileşimlerinin ve fiziksel özelliklerinin incelenmesi. Doktora tezi, Trakya Universitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı.

Bereiter-Hahn, J. Strohmeier, R., Kunzenbacher, I., Beck, K.,Voth, M. 1981. Locomotion of Xenopus epidermis cells in primary culture. J. Cell Sci., 52: 289-311.

Bereiter-Hahn, J. 2005. Mechanics of crawling cells. Med. Eng. Phys., 27: 743–753.

Beutler, E. 1975. The preparation of red cells for assay. İçinde: Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods. Grune and Straton Company, New York, 8-18.

Bissels, U. Eckardt, D., Bosio, A. 2013. Characterization and Classification of Stem Cells. İçinde: Steinhoff G. (eds) Regenerative Medicine. Springer, Dordrecht

Blaser, H. Eisenbeiss, S., Neumann, M., Reichman-Fried, M., Thisse, B., Thisse, C., Raz, E. 2005. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. J. Cell Sci., 118: 4027–4038.

Blaser, H. Reichman-Freid, M., Castanon,I., Dumstrei, K., Marlow, F.L., Kawakami,K., Solnica-Krezel,L., Heisenberg, C.P., Raz, E. 2006. Migration of Zebrafish Primordial Germ Cells: A Role for Myosin Contraction and Cytoplasmic Flow. Dev.Cell., 11:613-627

Blau, H.M. Brazelton, T.R.,Weimman, J.M. 2001. The evolving concept of a stem cell: entity or function. Cell, 106: 829-41.

Bleul, C.C. Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., Springer, T.A. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. Nature, 382: 829–833.

Braat, A.K. Speksnijder, J.E., Zivkovic, D. 1999. Germline development in fishes. Int. J. Dev. Biol., 43: 745-760.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.

Bray, D. White, J.G. 1988. Cortical flow in animal cells. Science, 239: 883–888.

Brown, A.R. Owen, S.F., Peters, J., Zhang, Y., Soffker, M., Paull, G.C., Hosken, D.J., Wahab, M.A., Tyler, C.R. 2015. Climate change and pollution speed declines in zebrafish populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 112: E1237–1246.

Budd, A. Banh, Q., Domingos, J., Jerry, D. 2015. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. J. Mar. Sci. Eng., 3: 329.

Bull, J.J. 1985. Sex determining mechanisms: an evolutionary perspective. Experientia, 41: 1285–1296.

Burger, J.A. Kipps, T.J. 2006. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. Blood, 107: 1761–1767.

Cannazik, O. Polat, B. 2014. Kök Hücre ve Veteriner Hekimlikte Uygulama Alanları. Atatürk Üni. Vet. Bil. Derg. 9(3): 198-205.

Canpolat, F. 2016. Hücre siklusu ve apoptoz. Güncel Dermatoloji Derg., 1(1): 11-17.

Charras, G.T. Yarrow, J.C., Horton, M.A., Mahadevan, L., Mitchison, T.J. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. Nature, 435: 365–369.

Chen, W. Liu, L., Ge, W. 2017. Expression analysis of growth differentiation factor 9 (Gdf9/gdf9), anti-müllerian hormone (Amh/amh) and aromatase (Cyp19a1a/cyp19a1a) during gonadal differentiation of the zebrafish, *Danio rerio.* Biol. Reprod. 96: 401–413.

Chiang, E.F. Yan, Y.L., Tong, S.K., Hsiao, P., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B.C. 2001. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. J. Exp. Zool., 290: 709–714.

Chilke, A.M. 2012. Development of Primordial Germ Cells (PGCs) in an Indian Freshwater Teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). Eur. J. Exp. Biol. 2(3): 631-640.

Chukwu, L.O. and C.C. Odunzeh: Relative toxicity of spent lubricantoil and detergent against benthic macro-invertebrates of a westafrican estuarine lagoon. J. Environ. Biol., 27: 479-484 (2006).

Colleen, S. Marks, A.D., Lieberman, M. 2007. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. 2. Baskı, Güneş Tıp Yayınları, Ankara.

Corvi, M.M. Stanley, Peterson, P., Kent, M.L., Feist, S.W., La Du, J.K., Volz, D.C., Hosmer, H., Tanguay, R. L. 2012. Investigating the impact of chronic atrazine exposure on sexual development in zebrafish. Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol., 95(4): 276–288.

Coşkun, G. Özgür, H. 2011. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Uni Tıp Fak. Derg., 20(3): 145-158.

Curtin, J.F. Cotter, T.G. 2003. Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis. Cell Signal, 15: 983-92.

Çelikezen, F.Ç. Ertekin, A. 2008. Ratlarda Akciğer Fibrozisinde Lipid Peroksidasyonu (MDA), Antioksidan Madde (Glutatyon, Seruloplazmin) ve Bazı Antioksidan Vitamin (B-Karoten, Retinol) Düzeylerinin İncelenmesi. YYÜ Vet. Fak. Derg., 2: 17-20.

Çiftçi, N. 2017. Oksidatif Stresin Kanserdeki Rolü: Antioksidanlar Kanser Progresyonunun Yakıtı Olabilir mi?. Ahi Evran Tıp Derg., 1: 8-13.

De Felici, M. 2000. Regulation of primordial germ cell development in the mouse. Int. J. Dev. Biol., 44: 575-580.

De Felici, DM. 2001. Twenty Years of Research on Primordial Germ Cells. Int. J. Dev. Biol., 45: 519-522.

Deng, J., Yu, L., Liu, C., Yu, K., Shi, X., Yeung, L.W.Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Zhou, B. 2009. Hexabromocyclododecane-induced developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. Aquat. Toxicol., 93(1): 29-36.

Deshpande, G. Swanhart, L., Chiang, P., Schedl, P. 2001. Hedgehog signaling in germ cell migration. Cell, 106: 759–769.

Doitsidou, M. Reichman-Freid, M., Stebler, J., Köprunner, M., Dörries, J., Meyer, D., Esguerra, C.V., Leung, T., Raz, E. 2002. Guidance of Primordial Germ Cell Migration by the Chemokine SDF-1, Cell, 111: 647-659.

Dorn, P.B. Rodgers, J.H., Gillespic, W.B., Lizotte, R.E., Dunn, A.W.1997. The effects of a C12-13 linear alkyl ethyolate surfactant on Periphyton, Macrophytes, invertebrates and fish in stream. Mesocosms. Environ. Toxicol. Chem., 16: 1634.

Dranow, D.B. Tucker, R.P., Draper, B.W., 2013. Germ cells are required to maintain a stable sexual phenotype in adult zebrafish. Dev. Biol. 376, 43–50.

Du, J. Cai, J., Wang, S., You, H. 2017. Oxidative stress and apoptosis to zebrafish (Danio rerio) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and ZnO nanoparticles. Int. J. Occup. Med. Environ. Health, 30(2): 213-229.

Ebrahimie, E. Moussavi Nik, S.H., Newman, M., Van Der Hoek, M., Lardelli, M. 2016. The Zebrafish Equivalent of Alzheimer's Disease-Associated PRESENILIN Isoform PS2V Regulates Inflammatory and Other Responses to Hypoxic Stress. J Alzheimers Dis., 52(2):581-608.

Eddy, E.M. 1975. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. Int. Rev. Cytol. 43: 261-276.

Egemen, Ö. 2000. Çevre ve Su Kirliliği, 3. Baskı. Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi, İzmir, 106-116.

Ellman, G.L. Courtney, K.D., Andres Jr., V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7: 88-95.

Elmore, S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol. Pathol., 35: 495–516.

Etchin, J., Kanki, J.P., Look, A.T. 2011. Zebrafish as a model for the study of human cancer. Methods Cell Biol., 105:309-37.

Evan, G. Littlewood, T. 1998. A matter of life and cell death. Science, 281: 1317-1321.

Fendinger, N.J. Versteeg, D.J., Weeg, E., Dyer, S., Rapaport, R.A. 1994. Environmental behavior and fate of anionic surfactants. İçinde: Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 527-557

Gamo, H. 1961. On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka, *Olyzias latipes.* Japan J Zool., 13: 101–115.

Gemberling, M. Bailey, T.J., Hyde, D.R., Poss, K.D. 2013. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. Trends Genet. TIG, 29(11): 10.1016/j.tig.2013.07.003.

Gerhard, G.S. Kauffman, E.J., Wang, X., Stewart, R., Moore, J.L., Kasales, C.J., Demidenko, E., Cheng, K.C. 2002. Life spans and senescent phenotypes in two strains of Zebrafish (*Danio rerio*). Exp. Geront., 37: 8–9.

Gledhill, W.E. 1975. Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonates. Appl. Environ. Microbiol., 30: 922-929.

Godin, I. Wylie, C., Heasman, J. 1990. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. Development, 108: 357-363.

Gomperts, M. Garcia-Castro, M., Wylie, C., Heasman, J. 1994. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. Development. 120(1):135–141.

Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Chaudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U. 2014. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. Asian Pac. J Cancer Prev., 15:4405-4409.

Guo, Y. Cheng, H., Huang, X., Gao, S., Yu, H., Zhou, R. 2005. Gene structure, multiple alternative splicing, and expression in gonads of zebrafish Dmrt1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 330: 950–957.

Güleş, Ö. Eren, Ü. 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg., 2: 73-78.

Gültekin, N. Karaoğlu, K., Küçükateş, E. 2008. Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri. Turk Kardiol. Dern. Arş., 36(2): 120-130.

Güneri Yıldız, M. Aras, S., Cansaran Duman, D. 2009. Telomerlerin yaşlanma ve kanserle ilişkisi. Türk Hij. Den. Biyol. Derg., 66(4): 187-195.

Güneş, A.M. 2005. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. J. Curr. Pediatr., 3: 36-42.

Halliwell, B. Gutteridge, J.M.C. 1996. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford, 10-19.

Hashim, M.A. Kulandai, J., Hassan, R.S. 1992. Biodegradability of branched alkylbenzene sulphonates. J. Chem. Tech. Biotechnol., 54: 207–214.

Houwing, S. Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., Plasterk, R.H., Hannon, G.J., Draper, B.W., Ketting, R.F. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. Cell, 129: 69–82.

Hršak, D. 1996. Cometabolic transformation of linear alkylbenzene-sulfonates by methanotrophs. Wat. Res., 30: 3092-3098.

Ikenishi, K. 1998. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. Dev. Growth Differ. 40: 1-10.

Ishii, Y. Samejima, Y., Saji, F., Nomura T. 1990. Effect of alcohol sulfate, linear alkyl benzene sulfonate and natural soap on the development of fertilized eggs of the mouse *in vitro*. Mutat. Res., 242: 151-155.

International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria 169. 2015. Linear Alkylbenzene Sulfonates and Related Compounds, http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc169.htm, 08.12.2015

İnan, S. Özbilgin, K. 2009. Kök hücre biyolojisi. Sağlıkta Birikim Derg., 1: 11-23.

Jensen J. 1999. Fate and effects of linear alkylbenzene sulfonates (LAS) in the terrestrial environment. Sci. Tot. Environ., 226(2): 93-111, 1999.

Jaglarz, M.K. Howard, K.R. 1995. The active migration of *Drosophila* primordial germ cells. Development, 121: 3495-3503.

Janson, L.W. Taylor, D.L. 1993. In vitro models of tail contraction and cytoplasmic streaming in amoeboid cells. J. Cell Biol., 123:345–356.

Johnston, P.M. 1951. The embryonic history of the germ cells of the largemouth blackbass, *Micropterus salmoides salmoides* (Lacepede). J Morph., 88: 471–543.

Jørgensen, A. Morthorst, J.E., Andersen, O., Rasmussen, L.J., Bjerregaard, P. 2008. Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation. Reprod. Biol. Endocrinol., 6: 25.

Kalra, K. Tomar, P.C. 2014. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. AJPCT. 2(7): 919-930.

Kansu, E., 2005. Kök hücre biyolojisi ve plastisitesinde güncel kavramlar. Hacettepe Tıp Derg., 36:191-197.

Karabulut, H. Gülay, M.Ş. 2016. Serbest radikaller. MAKÜ Sag. Bil. Enst. Derg., 4(1): 50-59.

Keha, E.E. Kühevioğlu, Ö.İ. 1997. Biyokimya, muhtelif kısımlar. Şafak yayınevi, Erzurum.

Kılınç, K. Kılınç, A. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Derg., 33:110-118.

Kızıl C. Kaslin, J., Kroehne, V., Brand, M. 2012. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. Dev Neurobiol., 72(3):429-61.

Kimmel, C.B. Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. 1995. Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. Dev. Dynam., 203: 25-310.

Kline, E.R. Figueroa, R.A., Rodgers J.H.Jr., Dorn, P.B. 1996. Effects of a nonionic surfactant (C14-15 AE-7) on fish survival, growth and reproduction in the laboratory and in outdoor stream. Mesocosms. Environ. Toxicol. Chem., 15: 997.

Knaut, H. Werz, C., Geisler, R. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. Nature, 421: 279-282.

Kocer, A. Reichmann, J., Best, D., Adams, I.R. 2009. Germ cell sex determination in mammals. Mol. Hum. Reprod., 15: 205–213.

Koç, N.D. 2008. Zebra balığının (*Branchydanio rerio*) primordiyal germ hücrelerinin göç sürecinde deltamethrin uygulamasinin etkileri. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi.

Koç, H. Güven, K.C. 2002. Toxicity and Identification of LAS in Tissue of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish J. Marine Sci. 3: 197-208.

Koç N.D. Yuce, R. 2012. A light- and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebrafish (*Danio rerio*), Biol. Res., 45: 331-336.

Koprunner, M. Thisse, C., Thisse, B., Raz, E. 2001. A zebrafish nanos-related gene is essential for the development of primordial germ cells. Genes Dev., 15: 2877-2885.

Krøvel, A.V. Olsen, L.C. 2004. Sexual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. Dev. Biol., 271: 190–197.

Kunwar, P.S. Lehmann, R. 2003. Germ-cell attraction. Nature, 421: 226-227.

Kuwana, T. Rogulska, T. 1999. Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. Cell Mol. Biol., 45: 725-736.

Lapidot, T. Dar, A., Kollet, O. 2005. How do stem cells find their way home?. Blood, 106: 1901–1910.

Lechuga, M. Fernández-Serrano, M., Jurado, E., Núñez-Olea, J., Ríos, F. 2016. Acute toxicity of anionic and non-ionic surfactants to aquatic organisms, Ecotoxicol. Environ. Saf., 125: 1-8.

Ledwozyw, A. Michalak, J., Stepień, A., Kadziołka, A. 1986. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. Clin. Chim. Acta., 155(3):275-83.

Lee, S.H. Kang, J.W., Lin, T., Lee, J.E., Jin, D.I. 2013. Teratogenic Potential of Antiepileptic Drugs in the Zebrafish Model. BioMed Res. Int., 726478, 1-6.

Li, K. Wu, J.Q., Jiang, L.L., Shen, L.Z., Li, J.Y., He, Z.H., Wei, P., Lv, Z., He, M.F. 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. Chemosphere, 171: 40-48.

Liwarska-Bizukojc, E. Miksch, K., Malachowska-Jutsz, A., Kalka J. 2005. Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactant. Chemosphere, 58: 1249-1253.

Lo, K.H. Hui, M.N., Yu, R.M., Wu, R.S., Cheng, S.H. 2011. Hypoxia impairs primordial germ cell migration in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. PLoS One 6, e24540.

Luzio, A. Matos, M., Santos, D., Fontainhas-Fernandes, A.A., Monteiro, S.M., Coimbra, A.M. 2016a. Disruption of apoptosis pathways involved in zebrafish gonad differentiation by 17α-ethinylestradiol and fadrozole exposures. Aquat. Toxicol., 177: 269–284.

Luzio, A. Monteiro, S.M., Rocha, E., Fontainhas-Fernandes, A.A., Coimbra, A.M. 2016b. Development and recovery of histopathological alterations in the gonads of zebrafish (*Danio rerio*) after single and combined exposure to endocrine disruptors (17(-ethinylestradiol and fadrozole). Aquat. Toxicol., 175: 90–105.

Maack, G. Segner, H. 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. J. Fish Biol., 62: 895–906.

Major, R.J. Poss, K.D. 2007. Zebrafish Heart Regeneration as a Model for Cardiac Tissue Repair. Drug Discov. Today. Dis. Models., 4(4): 219–225.

Makhija, D.T. Jagtap, A.G. 2014. Studies on sensitivity of zebrafish as a model organism for Parkinson's disease: Comparison with rat model. J Pharmacol Pharmacother., 5(1):39-46.

Marcomini A., Giger, W. 1987. Simultaneous determination of linear alkylbenzene sulfonates, alkylphenol polyethoxylates, and nonylphenol by high-performance liquid chromatography. Anal. Chem., 59: 1709-1715.

Mathur, A.K. Gupta, B.N., Agarwal, C., Pangtey B.S., Singh A.1987. Effect of detergent on skin. Ind. J. Med. Sci., 41: 168-171.

Mathur, A.K. 2005. Effects of dermal application of chromium and linear alkyl benzene sulphonate alone and in combination in guinea pigs. Toxicol. Int., 12: 9-12.

Mayden, R.L. Tang, K.L., Conway, K.W., Freyhof, J., Chamberlain, S., Haskins, M., Schneider, L., Sudkamp, M., Wood, R.M., Agnew, M., Bufalino, A., Sulaiman, Z., Miya, M., Saitoh, K., He, S. 2007. Phylogenetic relationships of *Danio* within the order Cypriniformes: A framework for comparative and evolutionary studies of a model species. J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol., 308B(5): 642–54.

Memişoğulları, R. 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Dicle Tıp Fak. Derg., 3: 30-39.

Millar, J.S. Debra, A.C., Mary, G.M., Deniel J.R., Jeffrey T.B.2005. Determining hepatic triglyceride production in mice: Comparison of poloxamer 407 with Triton WR-1339. J. Lipid. Res., 46: 2023-2028.

Minareci O. Bilgin N., Çakır M. 2013. İstanbul Büyükçekmece Gölü'nde Anyonik Deterjan, Fosfat ve Bor Kirliliğinin Araştırılması, CBÜ Fen Bil. Derg., 8(2): 52-60.

Mittal, A.K. Garg, T.K. 1994. Effect of an anionic detergent sodium dodecyl sulphate exposure on club cells in the epidermis of *Clarias batrachus*. J. Fish Biol., 44: 857-875.

Molyneaux, K. Wylie, C. 2004. Primordial germ cell migration. Int. J. Dev. Biol. 48: 537-544.

Moore, M.A. 2001. The role of chemoattraction in cancer metastases. Bioessays, 23: 674-676.

Murdoch, C. 2000. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. Immunol. Rev., 177: 175–184.

Nagai T, Yamaha E, Arai K. 2001. Histological Differentiation of Primordial Germ Cells in Zebrafish. Zool Sci. 18: 215-223.

Newman, M. Ebrahimie, E., Lardelli, M. 2014.Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. Front. Genet., 5:189.

Nikolic, A. Volarevic, V., Armstrong, L., Lako, M., Stojkovic, M. 2016.Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. Stem Cells Int., 2016: 1741072.

Nomura, T. Bata, S., Shibata K., Kusafuka T. 1987. Killing of preimplantation mouse embryos by main ingredients of cleansers AS and LAS. Mutat. Res., 190: 25-29.

Nomura, Y., Ikebukuro, K., Yokoyama, K., Takeuchi, T., Arikawa, Y., Ohno, S., Karube, I. 1998. Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring. Biosens. Bioelectron., 13: 1047-1053.

Oberlin, E. Amara, A., Bachelerie, F., Bessia, C., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Schwartz, O., Heard, J.M., Clark-Lewis, I., Legler, D.F., Loetscher, M., Baggiolini, M., Moser, B. 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. Nature., 382: 833–835.

Ohkawa, H. Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95: 351-8.

Okuthe, G.E. Hanrahan, S., Fabian, B.C. 2014. Early gonad development in zebrafish (*Danio rerio*). Afr. J. Biotechnol., 13(33): 3433-3442.

Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y. 2006. İnsan biyokimyası. II. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.

Oyar, P. 2016. Dental kök hücre kaynaklari ve kemik doku rejenerasyonunda kullanilma potansiyelleri. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg., 15: 96-101.

Özcan, O. Erdal, H., Çakırca, G., Yönden Z. 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. J.Clin. Exp. Invest., 6 (3): 331-336.

Özen, A. Sancak, İ.G. 2014. Mezenkimal kök hücreler ve veteriner hekimlikte kullanımı. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 61:79-84.

Palmer, A.K. Readshaw, M.A., Neuff A.M.1975. Assessment of the teratogenic potential of surfactants. Part III – Dermal application of LAS and soap. Toxicol., 4: 171-181.

Perales, J.A. Manzano, M.A., Sales, D., Quiroga, J.M. 1999. Linear alkylbenzene sulphonates: biodegradability and isomeric composition. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 63: 94-100.

Pollard, T.D., Borisy, G.G. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell., 112: 453–465.

Pradhan, A. Khalaf, H., Ochsner, S.A., Sreenivasan, R., Koskinen, J., Karlsson, M., Karlsson, J., McKenna, N.J., Orban, L., Olsson, P.E. 2012. Activation of NF-kappaB protein prevents the transition from juvenile ovary to testis and promotes ovarian development in zebrafish. J. Biol. Chem., 287: 37926–37938.

Rafelski, S.M. Theriot, J.A. 2004. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. Annu. Rev. Biochem., 73: 209–239.

Rana, S.V.S. Verma Y.2005. Biochemical toxicity of benzene. J. Environ. Biol., 26: 157-168.

Rani, R. Trivedi, S.P., Singh P., Singh R.K. 2002. Haematotoxic effect of linear alkyl benzene sulphonate (LAS) in fish, *Heteropneustes fosilis*. J. Environ. Biol., 23: 101-103.

Ressom, R.E. Dixon KE. 1988. Relocation and reorganization of germ plasm in Xenopus embryos after fertilization. Development. 103: 507-518.

Ribas, L. Liew, W.C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., Piferrer, F. 2017. Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 114(6): E941-E950.

Robertson, C.E. Wright, P.A., Koblitz, L., Bernier, N.J. 2014. Hypoxia-inducible factor-1 mediates adaptive developmental plasticity of hypoxia tolerance in zebrafish, *Danio rerio*. Proc. Biol. Sci., 281: 20140637.

Rodríguez-Marí, A. Yan, Y.L., Bremiller, R.A., Wilson, C., Canestro, C., Postlethwait, J.H. 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish Anti-Mullerian hormone (Amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. Gene Expr. Patterns, 5: 655–667.

Rodríguez-Marí, A. Cañestro, C., BreMiller, R.A., Nguyen-Johnson, A., Asakawa, K., Kawakami, K., Postlethwait, J.H. 2010. Sex reversal in zebrafish *fancl* mutants is caused by Tp53-mediated germ cell apoptosis. PLoS Genet., 6: e1001034.

Rodríguez-Marí, A. Postlethwait, J.H. 2011. The role of fanconi anemia/BRCA genes in zebrafish sex determination. İçinde: Methods in Cell Biology. Academic Press, 461–490.

Rodríguez-Marí, A. Wilson, C., Titus, T.A., Canestro, C., BreMiller, R.A., Yan, Y.L., Nanda, I., Johnston, A., Kanki, J.P., Gray, E.M., He, X., Spitsbergen, J., Schindler, D., Postlethwait, J.H. 2011. Roles of brca2 (fancd1) in oocyte nuclear architecture, gametogenesis, gonad tumors, and genome stability in zebrafish. PLoS Genet., 7: e1001357.

Rosety, M. Ordóñez, F.J., Rosety-Rodríguez, M., Rosety, J.M., Rosety, I., Carrasco, C., Ribelles, 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. Histol. Histopathol., 16: 839-843.

Roy, D. 1988. Effect of an anionic detergent on the lipid moieties of various cell types in the opercular epidermis of *Rita rita.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41: 352-359.

Saffman, E.E. Lasko, P. 1999. Germline development in vertebrates and invertebrates. Cell. Mol. Life Sci. 55(8-9):1141–1163.

Saito, T. Goto-Kazeto, R., Kawahami, Y., Nomura, K., Tanaka, H., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E. 2011. The Mechanism for Primordial Germ-Cell Migration Is Conserved between Japanese Eel and Zebrafish. PlosOne, 6(9): e24460.

Santos, E.M. Workman, V.L., Paull, G.C., Filby, A.L., Van Look, K.J., Kille, P., Tyler, C.R. 2007. Molecular basis of sex and reproductive status in breeding zebrafish. Physiol. Genom., 30: 111–122.

Santos, D. Luzio, A. Coimbra, A.M. 2017. Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors. Aquat. Toxicol., 191: 141-163.

Sarasquete C. Muñoz-Cueto J.A., Arellano J., González de Canales, M.L. 1997. Histofisiología e histopatología durante el desarrollo larvario de peces de interés en aquicultura. İçinde: Histofisiología e histopatología de especies marinas de interés en Acuicultura. Serv Public Univ Cádiz., 11-34.

Saxena, P. Sharma, S., Suryavathi, V., Grover, R., Soni, P., Kumar S., Sharma, K.P. 2005. Effect of an acute and chronic toxicity of four commercial detergents on the freshwater fish, *Gambusia affiris*. J. Environ. Biol., 47: 119-124.

Seok, S.H. Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Na, Y.R., Noh, K.J., Park, S.H., Lee, H.K., Lee, B.H., Park, J.H. 2008. In vivo alternative testing with zebrafish in ecotoxicology. J. Vet. Sci., 9(4):351-7.

Seriner, R. Bilgin, R. 2012. Katalaz Enziminin Hıyardan (*Cucimus sativus*) Saflaştırılması. Ç.Ü Fen ve Müh. Bil. Derg., 28(4): 85-94.

Seydoux, G., Mello, C.C., Pettitt, J., Wood, W.B., Priess, J.R., Fire, A. 1996. Repression of gene expression in the embryonic lineage of *C.elegans*. Nature 382: 713-716.

Seydoux, G. Dunn, M.A. 1997. Transcriptionally repressed germ cells lack a subpopulation of phosphorylated RNA polymerase II in early embryos of *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. Development, 124: 2191- 2201.

Seydoux, G. Strome, S. 1999. Launching the germ line in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells. Development 126: 3275-3283.

Sezer, K. Keskin, M. 2014. Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg., 28 (1): 49 – 56.

Scott, M.J. Jones, M.N. 2000. The biodegredation of surfactants in the environment. Biochim. Biophys. Acta., 1508: 235-251.

Shang, E.H. Wu, R.S. 2004. Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development. Environ. Sci. Technol., 38: 4763–4767.

Shang, E.H. Yu, R.M., Wu, R.S. 2006. Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Sci. Technol., 40: 3118–3122.

Sharma, S. Sharma S., Kumar, S., Soni, P., Bhardwaj, K.K., Grover, R., Suryavathi V., Sharma, K.P. 2004. Comparative effects of two consumer (fish) in the oligotrophic and eutrophic microcosms. Ind. J. Environ. Sci., 8: 95-102.

Shi, X., Du, Y., Lam, P.K.S., Wu, R.S.S., Zhou, B. 2008. Developmental toxicity and alteration of gene expression in zebrafish embryos exposed to PFOS. Toxicol. Appl. Pharmacol., 230(1): 23-32.

Shive, H.R. West, R.R., Embree, L.J., Azuma, M., Sood, R., Liu, P., Hickstein, D.D. 2010. brca2 in zebrafish ovarian development, spermatogenesis, and tumorigenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 107: 19350–19355.

Siegfried, K.R. Nusslein-Volhard, C. 2008. Germ line control of female sex determination in zebrafish. Dev. Biol., 324: 277–287.

Slanchev, K. Stebler, J., de la Cueva-Mendez, G., Raz, E. 2005. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 4074–4079.

Small, J.V., Resch, G.P. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. Curr. Opin. Cell Biol., 17: 517–523.

Small, C.M. Carney, G.E., Mo, Q., Vannucci, M., Jones, A.G. 2009. A microarray analysis of sex- and gonad-biased gene expression in the zebrafish: evidence for masculinization of the transcriptome. BMC Genom. 10: 579.

Sobrino-Figueroa, A.S. 2013. Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 165(4):528-532.

Soto-Suazo, M. San Martin, S., Ferro, E.S., Zorn T.M. 2002. Differential expression of glycosaminoglycans and proteoglycans in the migratory pathway of the primordial germ cells of the mouse. Histochem. Cell Biol., 118: 69-78.

Spierings, D.C. de Vries, E.G., Vellenga, E., van den Heuvel, F.A., Koornstra, J.J., Wesseling, J., Hollema, H., de Jong, S. 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. J. Histochem. Cytochem., 52: 821-831.

Sreenivasan, R. Cai, M., Bartfai, R., Wang, X., Christoffels, A., Orban, L. 2008. Transcriptomic analyses reveal novel genes with sexually dimorphic expression in the zebrafish gonad and brain. PLoS One, 3: e1791.

Sreenivasan, R. Jiang, J., Wang, X., Bartfai, R., Kwan, H.Y., Christoffels, A., Orban, L. 2014. Gonad differentiation in zebrafish is regulated by the canonical Wnt signaling pathway. Biol. Reprod. 90: 45.

Stallock, J. Molyneaux,K. Schaible,K., Knudson,C.M.,Wylie, C. 2003.The pro-apoptotic gene Bax is required for the death of ectopicprimordial germ cells during theirmigration in the mouse embryo. Development, 130: 6589-6597.

Starz-Gaiano, M. Cho, N.K., Forbes, A., Lehmann, R. 2001. Spatially restricted activity of a *Drosophila* lipid phosphatase guides migrating germ cells. Development, 128: 983–991.

Strohmeier, R. Bereiter-Hahn, J. 1984. Control of cell shape and locomotion by external calcium. Exp. Cell Res., 154: 412–420.

Strohmeier, R. Bereiter-Hahn, J. 1987. Hydrostatic pressure in epidermal cells is dependent on Ca-mediated contractions. J. Cell Sci., 88(5): 631-640.

Subramaniam K, Seydoux G. 1999. nos-1 and nos-2, two genes related to *Drosophila* nanos, regulate primordial germ cell development and survival in *Caenorhabditis elegans*. Development., 126: 4861-4871.

Sun, D. Zhang, Y., Wang, C., Hua, X., Zhang, X.A., Yan, J. 2013. Sox9-related signaling controls zebrafish juvenile ovary-testis transformation. Cell. Death Dis., 4: e930.

Tabakoğlu, E. Durgut, R. 2013. Veteriner Hekimlikte Oksidatif Stres ve Bazı Önemli Hastalıklarda Oksidatif Stresin Etkileri. AVKAE Derg., 3(1):69-75.

Takahashi, H. 1977. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Bull. Fac. Fish Hokkaido Univ. 28: 57–65.

Tan, C.H. Lee, T.C., Weeraratne, S.D., Korzh, V., Lim, T.M., Gong, Z. 2002. Ziwi, the zebrafish homologue of the *Drosophila piwi*: co-localization with vasa at the embryonic genital ridge and gonad-specific expression in the adults. Gene Expr. Patterns, 2: 257–260.

Tanka, J.N. Grizzle, J.M. 2002. Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. Aquat. Toxicol. 57(3): 117-125.

Tepass, U. Truong, K., Godt, D., Ikura, M., Peifer, M. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. Nature Rev. Mol. Cell Biol., 1(2): 91–100.

Terzić, S. Hršak, D., Ahel, M. 1992. Primary biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulphonates in estuarine waters. Wat. Res., 26: 585-591.

Toshima, Y., Moriya T., Yoshimura K. 1992. Effects of polyxyethylene (20) surbitan mono oleate on the acute toxicity of LAS (C12) to fish. Ecotocol. Environ. Saf., 24: 26-36.

Trivedi, S.P. Kumar, M., Mishra, A., Banerjee, I. and Soni, A. 2001. Impact of linear alkyl bengene sulphonate (LAS) on phosphatase activity in testis of the teleostean fish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). J. Environ. Biol., 22: 263-266.

Trivedi, S.P. Kumar M., Banerjee, I. 2002. Linear alkyl benzene sulphonate (LAS) induced xenobiotic anomalies in the activity of LDH and SDH in the muscles of fresh water teleost, *H. fossilis* (Bloch). J. Ecophysiol. Occup. Hlth., 2: 205-214.

Tüylü Küçükkılınç, T. 2014. Organofosfat zehirlenmelerinde asetilkolinesterazın biyotemizleyici olarak kullanılma olasılığı. Turk J. Biochem., 39 (2) ; 126–131.

Tzung, K.W. Goto, R., Saju, J.M., Sreenivasan, R., Saito, T., Arai, K., Yamaha, E., Hossain, M.S., Calvert, M.E., Orban, L., 2015. Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. Stem Cell Rep., 4: 61–73.

Uchida, D. Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. J. Exp. Biol., 205: 711–718.

Uludağ, Ö. 2015. Organik Fosfor Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavide Güncel Yaklaşımlar. Adıyaman Üniv Sağlık Bilim Derg, 1(2): 126-138.

Ural, A.U. 2006. Kök hücre. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, 5: 3-4.

Vaezi, G.H. Aliabadi, F., Shiravi, A.B., Pourkazem, M., Toosi, F. 2011. Histopathology of Inhalation of Industrial Bleach and Detergent Mixture on Epithelial Layer of Trachea in Mice. J. Chem. Health Risks, 1(1): 29-33.

Van Doren, M. Brohier, H.T., Moore, L.A., Lehmann, R. 1998a. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. Nature, 396: 466–469.

Van Doren, M. Williamson, A.L., Lehmann, R. 1998b. Regulation of zygotic gene expression in *Drosophila* primordial germ cells. Curr. Biol. 8: 243-246.

Varsha, J. Mishra, K.D., Madhuri, S., Govind, P. 2011. Linear alkyl benzene sulphonate, a detergent induced toxicity on the gill of *Puntius ticto* fish. Int. Res. J. Pharm. 2(10): 76-78.

Von Hofsten, J. Olsson, P.E. 2005. Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. Reprod. Biol. Endocrinol., 3: 63.

Wang, X.G. Orban, L. 2007. Anti-Mullerian hormone and 11β-hydroxylase show reciprocal expression to that of aromatase in the transforming gonad of zebrafish males. Dev. Dyn., 236: 1329–1338.

Wang, D.S. Kobayashi, T., Zhou, L.Y., Paul-Prasanth, B., Ijiri, S., Sakai, F., Okubo, K., Morohashi, K., Nagahama, Y. 2007a. Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. Mol. Endocrinol., 21: 712–725.

Wang, X.G.,Bartfai, R., Sleptsova-Freidrich, I., Orban, L. 2007b. The timing and extent of 'juvenile ovary' phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. J. Fish Biol., 70: 33–44.

Wang Y. Zhang, Y., Li, X., Sun, M., Wei, Z., Wang, Y., Gao, A., Chen, D., Zhao, X., Feng, X. 2015. Exploring the Effects of Different Types of Surfactants on Zebrafish Embryos and Larvae. Sci. Rep., 5: 10107.

Weber, L.P. Hill Jr., R.L., Janz, D.M. 2003. Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. Aquat. Toxicol. 63(4): 431-446.

Wei, K.H. Liu, I.H. 2014. Heparan sulfate glycosaminoglycans modulate migration and survival in zebrafish primordial germ cells. Theriogenology, 81(9): 1275-1285.

Weidinger, G. Wolke, U., Koprunner, M., Klinger, M., Raz, E. 1999. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. Development, 126: 5295–5307.

Weidinger, G. Wolke, U. Koprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., Raz, E. 2002. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. Development, 129: 25–36.

White, R. Rose, K., Zon, L. 2013. Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward. Nat. Rev. Cancer., 13(9):624-36.

Willey, J.B. Krone, P.H. 2001. Effects of endosulfan and nonylphenol on the primordial germ cell population in pre-larval zebrafish embryos. Aquat. Toxicol., 54(1-2): 113-123.

Williamson, A. Lehmann, R. 1996. Germ cell development in *Drosophila*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12: 365-391.

Wong, R.Y. McLeod, M.M., Godwin, J. 2014. Limited sex-biased neural gene expression patterns across strains in zebrafish (*Danio rerio*). BMC Genom., 15: 905.

Wu, M. Xu, H., Shen, Y. Qiu, W., Yang, M. 2011. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol a, nonylphenol and their mixture. Environ. Toxicol. Chem., 30(10): 2335-2341.

Wu, S. Guixiang, J., Liu, J., Zhang, S., Gong, Y., Shi, L. 2016. TBBPA induces developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in embryos and zebrafish larvae (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 31(10): 1241-1249.

Xi, Y. Noble, S., Ekker, M. 2011. Modeling Neurodegeneration in Zebrafish. Curr. Neurol. Neurosci. Rep., 11(3):274–282.

Xia, W. 2010. Exploring Alzheimer's disease in zebrafish. J Alzheimers Dis. 20(4):981-990.

Yahaya, T. Okpuzor, J., Oladele, E.O. 2011. Investigation of Toxicity of Detergents. J. Environ. Sci. Tech., 4(6): 638- 645.

Yang, Y.J. Wang, Y., Li, Z., Zhou, L., Gui, J.F. 2017. Sequential, divergent, and cooperative requirements of Foxl2a and Foxl2b in ovary development and maintenance of zebrafish. Genetics, 205: 1551–1572.

Ying, G.G. 2006. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environ. Int., 32: 417–431.

Yoon, C. Kawakami, K., Hopkins, N. 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. Development, 124(16):3157-3165.

Yön, N.D. Akbulut, C. 2015. Identification of Primordial Germ Cells: Cytological, Histological and Immunohistochemical Aspects. Braz. Arch. Biol. Technol. 58(2): 222-228.

Zengin Ulakoğlu, E. Gümüştaş, M.K., Belce, A., Altuğ, T., Kökoğlu, E. 1998. Strese Bağlı Mide Mukozası Hasarında Endojen Glutatyon Tükenişinin Enerji Metabolizması İle İlişkisi. Cerrahpaşa J. Med., 29(3): 1-7.

Zhang, N. Zhang, J., Purcell, K.J., Cheng, Y., Howard, K. 1997. The *Drosophila* protein Wunen repels migrating germ cells. Nature, 385: 64-67.

Zhao, S. Huang, J., Ye, J. 2015. A fresh look at zebrafish from the perspective of cancer research. J. Exp. Clin. Cancer Res., 34(1): 80.

Zlotnik, A. 2006. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. Contrib. Microbiol., 13: 191–199.

ÖZGEÇMİŞ

Cansu AKBULUT 06/02/1987 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2009 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden derece ile mezun oldu. 2010 yılında Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. Yüksek lisans eğitimini 2012 yılında Sakarya Üniversitesi'nde tamamladı. İtalya, İsviçre ve Almanya'daki çeşitli enstitülerde misafir araştırmacı olarak bulundu.