

T. C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNCİ KEFALİ (*Alburnus tarichi* GÜLDENSTÄDT, 1814)'NİN ÖZAFAGUS VE
BAĞIRSAĞINDA APOPTOZ VE HÜCRE PROLİFERASYONUNUN ÜREME
GÖÇÜ SIRASINDA ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Sait CEYLAN
DANIŞMAN: Doç. Dr. Burak KAPTANER

VAN-2018

T. C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNCİ KEFALİ (*Alburnus tarichi* GÜLDENSTÄDT, 1814)'NİN ÖZAFAGUS VE
BAĞIRSAĞINDA APOPTOZ VE HÜCRE PROLİFERASYONUNUN ÜREME
GÖÇÜ SIRASINDA ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Sait CEYLAN

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2018-6892 No'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Burak KAPTANER danışmanlığında, Sait CEYLAN tarafından sunulan “İnci kefali (*Alburnus tarichi* Gldenstdt, 1814)'nin özafagus ve Bağırsağında Apoptoz ve Hücre Proliferasyonunun reme Gücü Sırasında Araştırılması” isimli bu alışma Lisansüstü Eğitim ve ğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 09/11/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Güler NAL

İmza:

ye: Doç. Dr. Atilla DURMUŞ

İmza:

ye: Doç. Dr. Burak KAPTANER

İmza:

ye:.....

İmza:

ye:.....

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 16.11.2018 tarih ve 2018/57- I sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. SENSY
Enstitü Müdürü
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atf yapıldığını bildiririm.



Sait CEYLAN

ÖZET

İNCİ KEFALİ (*Alburnus tarichi* GÜLDENSTÄDT, 1814)'NİN ÖZAFAGUS VE BAĞIRSAĞINDA APOPTOZ VE HÜCRE PROLİFERASYONUNUN ÜREME GÖÇÜ SIRASINDA ARAŞTIRILMASI

CEYLAN, Sait

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burak KAPTANER

Kasım 2018, 30 sayfa

Bu çalışmada, Van Gölü'nün yüksek derecede alkali ve tuzlu olan suyundan tatlı suya göç eden inci kefalinin özafagus ve bağırsak epitelindeki hücresel yanıt, apoptoz ve hücre proliferasyonu ile araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda balık, Van Gölü'nden, çay (Karasu) girişinden ve çayın üst kısmından örnekledi. Özafagus epitelinde apoptotik hücrelerin rastgele dağılım gösterdiği ve apoptotik indeks (AI)'in, göl ve çaydan yakalanan bireyler arasında farklılık göstermediği belirlendi. Bu hücrelerin, çaydan örneklenen balıkların bağırsağında villus epiteli boyunca arttığı ve villusların uç bölgelerinde lokalize oldukları gözlemlendi. AI'nin çay girişinden ve çayın üst kısmından örneklenen bireylerin ön ve orta bağırsak epitelinde ve bağırsak epiteli boyunca yükseldiği tespit edildi. Özafagus epitelinde proliferasyon olan hücrelerin rastgele dağıldıkları ve proliferasyon indeksi (PI)'nin tatlı su ortamında dereceli bir şekilde azaldığı belirlendi. Prolifere olan epitel hücrelerinin bağırsak villuslarının bazal bölgesinde ve iki villus arasındaki çukur bölgede lokalize oldukları gözlemlendi. PI'nin, çay girişinden örneklenen balıkların ön bağırsak epitelinde ve bağırsak epitelinin genelinde yüksek olduğu, çayın üst tarafından örneklenen balıkların intestinal epitelinde ise değişmediği belirlendi. Sonuç olarak, inci kefalinde tatlı suya aklimasyon sırasında özafagus epitelinde gözlenen hücresel değişimlerin, diğer örihalin türlerden farklı olduğu gözlemlendi. Tatlı suya uyum sırasında bağırsak epitelinde belirlenen hücre dönüşümüne ait modifikasyonlar, epitelin permeabilitesi, hormonal düzenlenme ve oksidatif metabolizma ile ilişkili olabilir.

Anahtar kelimeler: *Alburnus tarichi*, Apoptoz, Bağırsak, Hücre proliferasyonu, Özafagus, PCNA, TUNEL



ABSTRACT

INVESTIGATION OF APOPTOSIS AND CELL PROLIFERATION IN THE ESOPHAGUS AND INTESTINE OF PEARL MULLET (*Alburnus tarichi* GÜLDENSTÄDT, 1814) DURING REPRODUCTIVE MIGRATION

CEYLAN, Sait

Master Thesis, Biology Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burak KAPTANER

November 2018, 30 pages

In this study, cellular response in the epithelia of the esophagus and intestine of pearl mullet that migrated from the highly alkaline and brackish water of Lake Van to fresh water were investigated by apoptosis and cell proliferation. Toward this aim, the fish were caught from Lake Van or upstream and at the entrance of a stream (Karasu) In the esophagus epithelium, apoptotic cells were observed as randomly distributed and the AI displayed no differences between fish from the lake or the stream. Those cells were determined to increase through the villus epithelium and become localized in the villus tips in the intestine of fish from the freshwater. The AI increased significantly at the anterior or mid-intestine epithelia and throughout the intestine epithelium, whereas it remained unchanged in the posterior intestine epithelium of fish from both upstream and at the entrance of the stream. In the esophagus epithelium, proliferating cells were observed as distributed randomly and the PI values decreased gradually in fish from freshwater. In the intestine, the proliferating epithelial cells were localized mainly in basal areas and troughs of the intestinal folds. The PI increased significantly in the anterior intestine epithelium or throughout the intestinal epithelium of fish collected from the entrance of the stream; however, it did not change along the intestinal epithelium of fish collected upstream. In conclusion, it was observed that cellular changes in the esophagus epithelium during acclimation to freshwater in pearl mullet differed from other euryhaline fish species. Modifications of the cell turnover in the intestinal epithelium during acclimation to freshwater might be related to epithelial permeability, hormonal regulations or oxidative mechanisms during acclimation to freshwater.

Keywords: *Alburnus tarichi*, Apoptosis, Cell proliferation, Esophagus, Intestine, PCNA, TUNEL



ÖN SÖZ

Van Gölü Havzası'nda yaşayan bir balık türü olan inci kefali (*Alburnus tarichi*), ekstrem koşullarda yaşayabilmesi, anadrom karaktere sahip olması ve endemik bir tür olması sebebi ile biyolojik açıdan oldukça dikkat çekici bir türdür. Bu balık türü, bir lav set gölü olma özelliği gösteren ve Dünya'nın en büyük soda gölü olan, Van Gölü'nün yüksek alkali ve tuzlu suyunda yaşayabilme yetisine sahip tek omurgalı hayvan türüdür. Van Gölü'nde kışlayan inci kefali, bahar mevsimi yaklaştığında göle dökülen tatlı sulara yönelir ve Mayıs-Haziran aylarında göle dökülen akarsulara giriş yapar. Balık zorlu bir göç yolculuğu sonrasında, üremesini tatlı suda gerçekleştirir ve üremesini tamamladıktan sonra tekrar Van Gölü'ne döner. Az önce de bahsedildiği gibi bu göç yolculuğu oldukça zorludur çünkü balık uzun bir süre kışladığı Van Gölü'nün alkali ve tuzlu suyundan tatlı suya geçerken, bir aklimasyon (uyum, alışma) süreci geçirir dolayısıyla bir ozmotik strese maruz kalır. Aynı zamanda akarsuya karşı yüzerek fiziksel performans gösterir. Akarsuya geçen inci kefalleri daha sonra üremek için uygun alanlar aramaya başlar. Bu esnada predatör türler (örneğin martılar) ve illegal avcılık yapan insanlar ile de mücadele ederek nihayetinde üremesini gerçekleştirir. Balığın neslini sürdürmek için gerçekleştirdiği göç davranışı ve sahip olduğu fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyon becerisi, başarılı bir üreme aktivitesi ile sonuçlanır. Balık bu önemli biyolojik özelliklerinden başka, bölgede yaşayan insanların sofrasını süsleyen önemli bir besin kaynağıdır. Türkiye İstatistik Kurumu verilerine göre yıllık ortalama dokuz bin ton civarında avlanan bu balık, balıkçılık yapan ve balık ticareti ile uğraşan insanların geçim kaynağıdır. Öte yandan balığın sergilediği göç davranışı, doğaseverlerin ilgisini çekerek bölgeye gelmelerini sağlar. Yani inci kefali hem bölge ekonomisine hem de bölgedeki eko-turizm faaliyetlerine önemli katkılar sağlar. Yukarıda söz edilen birçok nedenden dolayı, inci kefalinin biyolojisinin öğrenilmesi ve öğrenilen bilgilerin bilim dünyasına kazandırılması oldukça önemli ve gereklidir. Bu tez çalışmasında, Van Gölü'nden akarsuya göç eden inci kefalinin özafagus ve bağırsak epitelinde, hücre proliferasyonu ve apoptozda meydana gelen değişimlerin araştırılması amaçlandı. Bu amaç için, balık gölde iken (üreme öncesi) ve akarsuya geçtikten sonra (üreme dönemi) alınan dokuların epitel tabakalarında apoptotik indeks ve hücre proliferasyon indeksi hesaplanarak, karşılaştırıldı. Böylece balığın özafagus ve bağırsak

dokularının, üreme göçü sırasında meydana gelen çevresel değişimlere, verdiği hücrenel yanıt hakkında bilgi edinildi ve sonuçlar tartışıldı. Yapılan çalışmanın gelecekte bu balık türünde yapılacak benzer çalışmalar için temel oluşturacağı ve bilimsel literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Bu tez çalışması yapılırken, her türlü destek ve yardımını esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Burak KAPTANER'e ve manevi desteklerini benden eksiltmeksizin yanımda olan değerli aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: FYL-2018-6892). Projeye verdiği maddi destekten dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de ayrıca teşekkür ederim.

Sait CEYLAN

Van - 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Çalışma Alanı ve Balık Temini.....	11
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	11
3.3. Doku Alımı ve Histolojik Prosedürler.....	13
3.4. TUNEL Boyama.....	14
3.5. PCNA İmmun Boyaması.....	15
3.6. Hücre Sayımı.....	16
3.7. İstatistiksel Analizler.....	16
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	23
KAYNAKLAR.....	27
ÖZ GEÇMİŞ	



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Van Gölü suyu ve Karasu Çayı suyunun fiziko-kimyasal özellikleri.....	18
Çizelge 4.2. İnci kefalinin anadrom göçü sırasında, Van Gölü, Karasu Çayı girişi ve Karasu Çayı üst tarafından örneklenen bireylerin özafagus ve bağırsak (ön, orta, son ve incelenen bütün bölümler) epitelinde apoptotik indeks değerleri.....	22
Çizelge 4.3. İnci kefalinin anadrom göçü sırasında, Van Gölü, Karasu Çayı girişi ve Karasu Çayı üst tarafından örneklenen bireylerin özafagus ve bağırsak (ön, orta, son ve incelenen bütün bölümler) epitelinde proliferasyon indeksi değerleri.....	22

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Çalışma alanının haritası ve örnekleme noktaları (1: Van Gölü; 2: Karasu Çayı Girişi; 3: Karasu Çayı'nın üs tarafı) (Kaynak: Google Earth, Google Maps).....	13
Şekil 4.1. TUNEL yöntemi ile boyanan özafagus kesitlerinde apoptotik epitel hücreleri. Çok katlı olan ve mukus hücresi içeren özafagus epitelinde TUNEL-pozitif hücreler, kahverengi görünmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi; c: Karasu Çayı üst tarafı).....	19
Şekil 4.2. Van Gölü (a), Karasu Çayı girişi (b) ve Karasu Çayı üst tarafından yakalanan inci kefalı bağırsak villus epitelinde apoptotik (TUNEL-pozitif) hücreler.....	20
Şekil 4.3. PCNA immun boyanması yapılan özafagus kesitlerinde proliferen olan epitel hücreleri. Çok katlı olan ve mukus hücresi içeren epiteldeki PCNA-pozitif hücreler, kahverengi görünmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi; c: Karasu Çayı üst tarafı).....	20
Şekil 4.4. PCNA immun boyanması yapılan bağırsak kesitlerinde, villus epitelinde lokalize olan PCNA pozitif hücrelerin görüntüsü. Görüntüde, PCNA-pozitif hücrelerin, villusun bazal bölgesini ve villuslar arasındaki çukur bölgeleri örten epitelde lokalize olduğu görülmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi). Çay girişinden örneklenen bireylerde, proliferen olan epitel hücrelerinin, villusun bazalinden apeksine doğru yoğunlaşarak arttığı gözlenmiştir.....	21



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
‰	Binde
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
l	Litre
M	Molar
meq	Miliekivalan
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mS	Milisimens
ppt	Binde bir (mili)
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µS	Mikrosimens

Kısaltmalar	Açıklama
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DNaz	Deoksiribonükleaz
HRP	Horseradish peroksidaz

PCNA	Prolifere olan Hücre Çekirdek Antijeni
TBS	Tris Tuz Tamponu
TdT	Terminal deoksinükleotidil Transferaz
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TUNEL	Terminal deoksinükleotidil Transferaz Aracılı Çentik Uç İşaretleme



1. GİRİŞ

Hayvanlarda göç, enerji rezervlerinin büyümeye, üremeye ve organizmanın hayatta kalmasına aktarıldığı, diğer bir deyişle yüksek derecede enerji gereksiniminin olduğu, bir olaydır (Constantini, 2008). Anadrom inci kefali (*Alburnus tarichi* Gldenstdt, 1814), üremek için bahar aylarında (yoğunluklu olarak Mayıs) Van Gölü'nden tatlı sulara göç eden, endemik bir Cyprinidae türüdür. İnci kefalinin yaşamının büyük bir bölümünü geçirdiği ve kışladığı Van Gölü'nün suyu alkali (pH: 9.8) ve tuzlu (%o 22) olması sebebi ile oldukça ekstrem bir evre teşkil eder ve inci kefalinden başka bir omurgalı hayvana yaşama olanağı tanımaz. İnci kefali de, diğer hayvanlarda olduğu gibi, gerçekleştirdiği g esnasında birçok zorlukla karşılaşır. İnci kefali tatlı suya g ederken ozmotik bir stres yaşar ve bunun üstesinden gelebilmek için, fizyolojik ve biyokimyasal adaptasyonlar gösterir. Balık uygun üreme alanları bulmak için çıktığı g yolculuğu sırasında akarsu akıntısına karşı koyar ve normalden daha fazla bir fiziksel aktivite gösterir (Danulat ve Selcuk, 1992; Danulat, 1995). Tatlı suya g esnasında, sudaki fiziko-kimyasal değişimler ile ilişki olarak balıkta fizyolojik bir stres meydana gelir (Arihan ve ark., 2016). Omurgalı hayvanlar g davranışı esnasında nasıl ki enerjiye ihtiyaç duyuyorlarsa, üreme faaliyeti sırasında da enerjiye, zamana ve besin maddelerine ihtiyaç duyarlar (Alonso-Alvarez ve ark., 2004). Dolayısıyla inci kefalinin de başarılı bir üreme aktivitesi için enerji harcaması gerekir. İnci kefalinin gerçekleştirdiği göç sırasında, martı gibi predatör türler ve illegal avcılık yapan insanlar tarafından tehdit edilmesi de karşılaştığı güçlükler arasındadır. Yukarıda sözü edilen birçok nedenden dolayı, inci kefalinin gerçekleştirdiği anadrom g davranışı, g biyolojisinin anlaşılması ve bu alanda yapılan çalışmalar için, önemli bir model organizma olarak kullanımına olanak sağlar. Yani inci kefalinin üreme göçü esnasında biyolojisinde meydana gelen değişimlerin öğrenilmesi ve bunların altında yatan sebeplerin aydınlatılması, hem türün kendisi açısından hem de bilimsel literatüre katkı yapılması açısından oldukça önem teşkil eder.

Balıklarda sindirim kanalı hem sindirim hem de osmoregülasyon ile ilişkilidir (Meister ve ark., 1983; Ciccotti ve ark., 1993; McCormick, 2001; Tyler ve Grosell, 2006). Geçmişte farklı balık türleri ile yapılan bilimsel çalışmalar, sindirim kanalının özafagus

ve bağırsak bölümlerinin, tuzluluk değişimi (Takahashi ve ark., 2006a), kirleticilere maruz kalma (Ferrando ve ark., 2005) gibi eksternal faktörlere ve hormonlar (Takahashi ve ark., 2006b) gibi internal faktörlere karşı hassas olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, dikkat çekici biyolojik özelliklere sahip olan inci kefalinin Van Gölü'nün alkali ve tuzlu suyundan tatlı suya göçü sırasında, özafagus ve bağırsak epitelinde meydana gelen hücresel yanıtın araştırılması amaçlandı. Bu amaç için üreme dönemi öncesinde Van Gölü'nden, üreme döneminde ise balığın göç ettiği Karasu Çayı'nın girişinden ve üst tarafından yakalanan bireylerin özafagus ve bağırsak epitelinde apoptoz ve hücre proliferasyonu kantifiye edildi. Bu dokulardan alınan histolojik kesitlerde apoptotik ve proliferen hücrelerin işaretlenmesi için, oldukça popüler yöntemler olan TUNEL (terminal deoksiniükleotidil transferaz aracılı çentik uç işaretleme) ve PCNA (çoğalan hücre çekirdek antijeni) boyamaları tercih edildi. Çalışmada farklı örnekleme bölgelerinden (Van Gölü ve Akarsu) her iki değişkene ait elde edilen veriler karşılaştırılarak, elde edilen bulguların sebepleri tartışıldı. Bu çalışmadan elde edilen bulguların balığın biyolojisine ve bilimsel literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

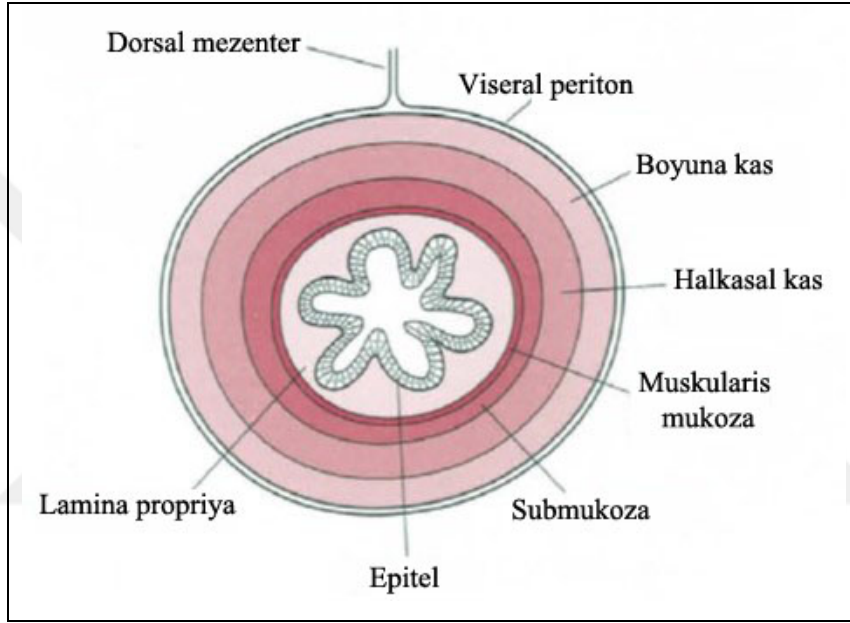
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Bazı balık türleri hem tatlı sularda, hem de tuzlu sularda yaşarlar ve bu iki çevre arasında rutin olarak göç ederler. Katadrom balıklar deniz suyunda yumurtadan çıkarlar, juvenil olduklarında tatlı suya göç ederler ve üremek için okyanusa geri dönmeden önce burada erginleşirler (örn.: *Anguilla* sp., *Liza ramada*, *Platichthys flesis*). Anadrom balıklar ise tatlı sularda dünyaya gelirler, juvenil olduklarında okyanuslara göç ederler ve burada erginleştikten sonra tekrar üremek için tatlı sulara göç ederler (örn.: *Oncorhynchus gorbuscha*, *Oncorhynchus keta*) (Obande ve ark., 2014; Binder ve ark., 2015; Kipanyula ve Maina, 2016). Tatlı ve tuzlu su çevresi arasındaki geçişler, balıklarda anatomik değişimlere yol açar. Bunlardan bazıları, vücut şekli ve uzunluğunda değişim, pigmentasyonda değişim, maksilla, mandibula ve dil üzerinde dişlerin ortaya çıkması ve gelişmesi, kloak açıklığına bitişik olan bağı dokusu kıvrımlarının şeklinde değişim, pelvik yüzgecin aksillar uzantısında değişim ve pullarda büyüme gibi değişimlerdir. Tatlı ve tuzlu su ekosistemleri arasındaki göç, anatomik değişimlere ek olarak, bazı organlarda morfolojik değişimlere de yol açar. Bu organlar arasında, solungaçlar, böbrekler ve sindirim sisteminin özafagus ve bağırsak bölümleri sayılabilir (Kipanyula ve Maina, 2016).

Tatlı ve tuzlu su ortamları arasında geçiş sırasında sindirim kanalında meydana gelen histolojik değişimler ve bu değişimlerin nedenlerinden bahsetmeden önce, balıklarda sindirim sisteminin yapısı ve fonksiyonuna değinmemiz yerinde olacaktır. Balıklarda sindirim sistemi temel olarak sindirim kanalı ve sindirim bezlerinden (gastrik - intestinal bezler, karaciğer ve pankreas) oluşur. Bununla birlikte, bu kısımların farklılaşma derecesi çok yakın türler arasında bile, belirgin olarak farklılaşır. Sindirim kanalı, ağızdan anüse kadar uzanan, bazı formlarda sarmallı ve segmentli, bazılarında ise düz ve farklılaşmamış bir tüp şeklindedir. Sindirim kanalında, ağız boşluğu, farinks, özofagus, mide ve bağırsak ayırt edilebilen bölümlerdir. Öte yandan, siphonidler (Cyprinidae) gibi birçok balık türü gerçek bir mideye sahip değildirler sadece ön bağırsak kısmında bir genişlemeye (intestinal bulb) sahiptirler. Balıklarda sindirim kanalı duvarının histolojik yapısı, genellikle yüksek omurgalılarıdakine benzerdir ve dört temel tabakadan oluşur. Bu tabakalar da kendi içerisinde, ışık mikroskobu altında

tanımlanabilen, daha alt tabakalara ayrılır. Bu tabakalar ve bunların alt tabakaları şunlardır:

1. Mukoza (a. mukoza epiteli, b. bazal lamina, c. lamina propriya, d. muskularis mukoza)
2. Submukoza (a. stratum kompaktum, b. stratum granulosum)
3. Muskularis (a. halkasal kas tabakası, b. boyuna kas tabakası)
4. Seroza (a. tella subseroza, b. seröz membran) (Şekil 1) (Takashima and Strüssman, 1995)



Şekil 1. Balıkların sindirim kanalında doku tabakalarının organizasyonu (Buddington ve Kuz'mina, 2000).

Özafagus epiteli çok katlıdır, esas olarak kübik hücreler ile birlikte mukus salgılayan goblet hücrelerinden oluşur ve bazen lenfositleri içerir. Özafagusta submukoza, bağ dokusunun fazla olmasından dolayı kalındır. Çizgili kas fibrilleri iki tabaka halinde görülebilir. Sindirim kanalında çizgili kasın görüldüğü diğer bir bölge ise yalnızca anal sfinkterdir. Bazı türlerde çizgili kas, özafagus kuyruk tarafına doğru uzandıkça, dereceli olarak yerini düz kasa bırakır. Öte yandan bazı türlerde ise çizgili kas özafagus boyunca görülebilir hatta özafagusun kavdal ucuna doğru daha da gelişebilir, buna örnek olarak sazanda özafagusun genişlemiş terminal ucu verilebilir (Buddington ve Kuz'mina, 2000).

Balıklarda bağırsak, sindirim yüzeyini artıran ve miktarı proksimalde artarken distalde ise azalan villuslar ile döşelidir. Bağırsakta sindirim yüzey alanının artırılmasına yönelik farklı stratejiler mevcuttur. Bunlara uzun bağırsak boyu, daha kompleks mukoza yapısı, pilorik çekelerin varlığı ve spiral bir valfin gelişimi, örnek olarak verilebilir. Bağırsağın basit epitelinde hakim olan hücre tipi, emilim yapan silindirik enterositlerdir. Bazen kübik olabilen bu hücreler, bazı ilkel türlerde silli olabilmektedirler. Kutuplaşma gösterdiği düşünülen bu hücrelerin, bağırsağın lümenindeki içeriğe maruz kalan apikal yüzeyleri, suda çözünebilen besinlerin son hallerinin tamamlanmasını sağlayan, enzimlere sahiptir. Apikal yüzeydeki transporter adı verilen diğer proteinler ise yapıtaş bileşenlerinin emiliminden sorumludur. Bazolateral yüzey, kandan besinlerin taşınımını gerçekleştiren, farklı grup taşıyıcı proteinler dahil olmak üzere, başka bir dizi fonksiyonel proteine sahiptir. Membran sindirimi terimi, enterositlerin enzimler ve mukoza tabakasını örtücü özellikleri ile bağlantılı, fonksiyonel aktivitelerini tanımlamak için kullanılır. İntestinal epitel oluşturur enterositler sürekli yenilenirler. Yeni enterositler proliferen olan kök hücrelerden villusun tabanında üretilir. Enterositler arasında yayılım gösteren goblet hücreleri, salgı granülleri ile doludur. Goblet hücrelerinden salgılanan mukus ve diğer sindirim salgıları, epitelı örten bir sınır tabakası oluşturur ki buna glikokaliks adı verilir. Bağırsak epitelindeki diğer hücreler, makrofaj gibi bağışıklık ile ilişkili hücreler ve endokrin salgı fonksiyonuna sahip olan hücrelerdir. Bağırsağın submukoza tabakası, bağ dokusunu, kan ve lenf damarlarını, düz kas fibrillerini ve sinirleri içerir. Bağırsağın diğer bir anahtar fonksiyonu, invazyona (patojen saldırısına) karşı savunma fonksiyonudur. Bu fonksiyon, spesifik ve spesifik olmayan savunma mekanizmaları ile gerçekleştirilir. Spesifik olmayan savunma mekanizmaları, etkili bir bariyer oluşturur, enterositlerdeki sıkı bağlantıları kapsar. Goblet hücrelerinden salgılanan mukus da patojen saldırılarına karşı bir bariyer oluşturur. Epiteldeki ve epitelı çevreleyen dokulardaki fagositik hücreler, epitel bariyerini geçmeye çalışan organizmalara karşı koyar. Balık bağırsağında bulunan intraepitelial ve mukozal lenfositler, spesifik antijenleri tanırlar ve onlarla reaksiyona girerler (Buddington ve Kuz'mina, 2000).

Balık bağırsağının sindirim, emilim ve endokrin fonksiyonlarının yanısıra, başka bir önemli rolü daha vardır; bu da ozmoregülasyondur. İntestinal epitel, ozmoregülasyon için önemli bir dokudur. Denizlerde yaşayan balık türleri, vücut sıvılarının ozmotik kaybını karşılamak için, deniz suyu içmek zorundadırlar. İçilen suyun tuzu özafagusta

uzaklaştırılır ve bağırsak vasıtasıyla emilimi sağlanır. Ozmotik kaybın üstesinden, deniz suyunda bulunan tek değerlikli iyonların (Na^+ ve Cl^- gibi) bağırsaktan emilimi ile gelinir. Böylece suyun bağırsak dışına hareketi ve kana geçişi sağlanır ve fazla iyonlar solungaçlar vasıtasıyla atılır. Farklı tuzluluk derecelerine uyum esnasında bağırsağın hidrolitik ve transport fonksiyonlarında değişimler gözlenir. Öte yandan tatlı su balıklarında sindirim kanalının osmoregülasyona katılımı ile ilgili bir delil bulunmamaktadır (Kirsch ve Meister, 1982; Kirsch, 1984, Ciccotti ve ark., 1993; Buddington ve Kuz'mina, 2000).

Bundan sonraki kısımlarda, bu tez çalışmasının kapsamı ile ilgili olarak kısaca, tatlı su ve tuzlu su ortamları arasındaki geçişler sırasında, balık türlerinin özafagus ve bağırsağında meydana gelen değişimlerden söz edilecektir.

Japon yılan balığı (*Anguilla anguilla*)'nın özafagus epitelinde yapılan sitolojik ve histolojik çalışmalarda, tatlı suya uyum sağlayan balıkların özafagusunun, bol miktarda mukus hücresi içeren çok katlı epitel ile örtüldüğü, tuzlu suya uyum sağlamış olan balıklarda ise epitelin silindirik olduğu ve mukus hücresi içermediği bildirilmiştir. Deniz suyuna uyum sonrasında, özafagus epitelinde meydana gelen bu değişimlerin, iyon/su permeabilitesindeki düzenlenme ile ilişkili olduğu düşünülmüştür (Yamamoto, 1978).

Cataldi ve ark. (1988), Nil tilapyası (*Oreochromis niloticus*)'nın 15 günlük juvenillerinin, dereceli olarak deniz suyuna (%10, 20, 30 ve 35) aklımasyonlarını sağlamışlar, sonrasında da özafagus epitelindeki morfolojik değişimleri incelemişlerdir. Araştırmacılar deniz suyunun % 10'luk konsantrasyonunda tutulan bireylerde, kontrollerde olduğu gibi, zengin mukus hücreli çok katlı epitelin gözlendiğini ve herhangi bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte % 20, 30 ve 35'lik deniz suyu konsantrasyonlarında çok katlı epitel içerisinde, iyon transportunda rol oynayan tek katlı silindirik epitel bölgelerinin oluştuğunu ve bu bölgelerin yüksek tuzluluğa maruz kaldıkça, arttığını gözlemlemişlerdir. Bu bulgulardan yola çıkılarak özafagusun osmoregülasyon ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Tuzluluğun % 0.5 olduğu nehir ağzından yakalanan yılan balığının tatlı su ve deniz suyuna aklımasyonu sonrasında, sindirim kanalında meydana gelen değişimleri inceleyen Ciccotti ve ark., (1993), posterior özafagus mukozasının lümen bölgesindeki epitelinin, tatlı suda çok katlı hale dönüştüğünü ve yoğun mukus hücresi içerdiğini, deniz suyunda ise hücrelerin aralarında geniş boşlukların meydana geldiğini ve tek katlı

silindirik epitel bölümlerinin varlığını gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda, tatlı suda ön bağırsak villuslarının genişlediğini, deniz suyunda ise küçük kaldığını ve deniz suyunda bağırsağın posteriyör kısmının dilate olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar osmoregülasyonda önemli bir role sahip olan sindirim kanalının, tatlı ve tuzlu suya uyum sırasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Apoptoz, embriyonik morfogenez, metamorfoz ve hormon uyarımlı dokuların şekillenmesi gibi temel biyolojik olaylarda rol oynayan hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoza giden hücrelerde en erken değişim, hücrenin komşu hücrelerle bağlantısının ve mikrovillus gibi plazma membranı yapılarının ortadan kalkmasıdır. Apoptozun başlangıç aşamasında, sitoplazmik hacmin küçülmesi ve sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşmasından dolayı hücre büzülür ancak hücre zarı bütünlüğünü korur. Kromatin, nukleus periferine kondanse olur ve kısımlara ayrılır. Sitoplazmik hacmin azalması iyon ve sıvı kaybına yol açar, bunun neticesinde, endoplazmik retikulum dilatasyona uğrar ve plazma membranıyla birleşen veziküllere bölünür. Bu olaylar sırasında birçok organel ve mitokondri canlılığını korur. Daha sonraki aşamada ise plazma membranında blebler oluşur ve hücre kısımlara bölünür. Apoptotik cisimler adı verilen bu kısımlar, organelleri, nukleus kısımlarını ve hücre artıklarını içeren paketlerdir. Apoptozun son aşamasında apoptotik cisimler, kendilerine komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. (Schwartzman ve Cidlowski, 1993).

Apoptozun en karakteristik biyokimyasal özelliklerinden biri Ca^{2+}/Mg^{2+} bağımlı endonükleaz aktivitesi sonucunda, DNA'nın internükleozomal bölgelerden düzenli olarak kesilerek 180-200 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentlerinin oluşmasıdır (Wyllie, 1980). Endonükleaz aktivitesi ile oluşan kırık DNA'nın, 3'-OH uçlarının terminal transferaz enzimi ile işaretlenmesi ve işaretli bölgelerin biyotin-avidin-peroksidaz tekniği ile boyanması (TUNEL: Terminal deoksinükleotidil transferaz aracılı çentik uç işaretleme) apoptotik hücrelerin histolojik kesitlerde, tek hücre seviyesinde ve ışık mikroskopu kullanılarak incelenmesine olanak verir (Gavrieli ve ark., 1992). Apoptotik hücrelerin belirlenmesinde TUNEL yöntemi, hassas ve spesifik bir methodur (Kylarová ve ark., 2002).

Prolifere olan hücre çekirdek antijeni (PCNA) hücre siklusunun S safhası için esansiyel ve evrimsel açıdan yüksek derecede korunmuş olan bir moleküldür. Bu molekül, hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında sentezlenen bir polimeraz delta

aksesuar proteinidir. PCNA, aktif olarak replike olan veya çoğalan hücreler için bir markır olup, bu hücrelerin parafin kesitlerde incelenmesine ilişkin bilgi sunar (Wolf ve Dittrich., 1992; Casasco ve ark.,1993).

Geçmişte balıklarda yapılmış olan bilimsel araştırmalar, farklı çevresel faktörlerin ve beslenme durumunun, özafagus ve bağırsaktaki apoptozu ve hücre proliferasyonunu etkilediğini ortaya koymuştur. Örihalin bir balık türü olan çamur zıpzı (*Periophthalmus modestus*)'nın özafagus epitelinde meydana gelen apoptozun deniz suyuna aklimasyon sırasında, hücre proliferasyonunun ise tatlı suya aklimasyon sırasında arttığı gözlenmiştir. Araştırmacılar gastrointestinal yolda epiteliyal apoptoz ve hücre proliferasyonunda gözlenen değişimlerin, örihalin türlerin çevredeki farklı salinite düzeylerine aklimasyonu sırasında, osmoregülasyon özelliklerindeki değişimlerden kaynaklandığını, ileri sürmüşlerdir (Takahashi ve ark.. 2006a).

Başka bir çalışmada çamur zıpzı (*Periophthalmus modestus*)'nın özafagusunda tuzluluğa aklimasyon sırasında gastrointestinal hücre dönüşümünün endokrin düzenlenmesini inceleyen Takahashi ve ark., (2006b), prolaktinin epitel hücre proliferasyonunu artırdığını ancak epiteliyal apoptozu etkilemediğini, kortizolün ise hem epitel hücre proliferasyonunu hem de epiteliyal apoptozu uyardığını gözlemlemişlerdir. Öte yandan, triiyodotironin ve 11-deoksikortikosteronun ne hücre proliferasyonu ne de apoptoz üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar, prolaktin ve kortizolün saliniteye uyum sırasında, anteriör bağırsaktaki epitel hücre dönüşümünün düzenlenmesinde rollerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Çevresel salinite değişimlerinin örihalin Mozambik tilapyası (*Oreochromis niloticus*)'nın özafagusundaki etkilerini inceleyen Takahashi ve ark.,(2007), tatlı suya aklimasyondan sonra hücre proliferasyonunun özafagus epiteli boyunca arttığını, tuzlu suya aklimasyondan sonra ise özafagus epitel katlarının uç kısımlarında hücre bölünmesinin ve apoptozun meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Plazma prolaktin düzeyinin tatlı suya aklimasyondan sonra yükseldiğini tespit eden araştırmacılar, tatlı suya uyum sağlamış olan balığın özafagusundaki prolaktin reseptör mRNA seviyelerinin, deniz suyuna uyum sağlamış olanlara göre önemli bir şekilde yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar, prolaktinin örihalin Mozambik tilapyasında özafagus epitelinin hücresel dönüşümünü, direkt olarak etkilediğini gözlemlemişlerdir.

Bağırsak epitelinde apoptoz ve hücre proliferasyonu çevredeki salinite değişimlerinden başka, beslenme rejimine ve besin tipine göre de değişebilmektedir. Örneğin, çekiç kafa köpek balığı (*Sphyrna lewini*)’nda açlığın ve aç bırakılma sonrasında yeniden beslenmenin, bağırsaktaki epitelial apoptoz ve hücre proliferasyonu üzerine etkisini araştıran Takahashi ve ark. (2014), aç kalma süresince apoptozun azaldığını ve açlık sonrasında yeniden beslenmenin apoptozu, beslenen balıklarındaki seviyeye geri getirdiğini bildirmişlerdir. Diğer taraftan, proliferen olan epitel hücre miktarının açlık sırasında azaldığını gözlemlemişlerdir. Böylece, çekiç kafa köpek balığında açlık ve aç bırakılma sonrasında yeniden beslenmenin, intestinal epitel apoptozunu ve hücre proliferasyonunu değiştirdiği gösterilmiştir. Sirri ve ark., (2014) dil balığı (*Solea solea*)’ını midyeden hazırlanan yemin artan konsantrasyonu ile besledikten sonra, intestinal bölgelerdeki histomorfolojik değişimleri incelemişlerdir. Araştırmacılar, midye yemi diyeti uygulanan balıkların bağırsağında, enterosit proliferasyonunun azaldığını ve apoptozunun ise önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir.

Yukarıda bahsedilen bilimsel çalışmalardan farklı olarak, balıkların yaşadığı ortamdaki çevresel olumsuzluklar da bağırsak epitel apoptozu ve proliferasyonunda değişikliklere yol açabilmektedir. Örneğin, İtalya’da ağır metal kirliliğinin olduğu göllerde yaşayan balığın (*Liza aurata*) bağırsak epitelinde, PCNA ve TUNEL pozitif hücrelerin sayısının, kirliliğin olmadığı bölgede yaşayanlara göre, arttığı rapor edilmiştir. (Ferrando ve ark., 2005).

Van Gölü havzasında yaşayan inci kefali (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814), Cyprinidae familyasına ait endemik bir balık türüdür. 3574 m² yüzey alanı ile Türkiye’nin en büyük gölü olan Van Gölü, Dünya’nın ise bilinen en büyük soda gölüdür. Gölün suyu yüksek derecede alkali (pH: 9.8) ve tuzludur (% 22). Van gölünde yaşayan tek omurgalı tür olan inci kefali, anadrom karakterlidir. Bu balık, Nisan ayının ortasında başlayan ve Temmuz ayının ortasına kadar devam eden üreme döneminde, yumurta ve sperm bırakmak için göle dökülen akarsulara göç eder (Danulat ve Selçuk, 1992). İnci kefali, yıllık avlanma miktarı 8.500 tonun üzerinde olan (TÜİK, 2013) ekonomik öneme sahip bir türdür.

İnci kefali gerçekleştirdiği anadrom göç esnasında bir habitatdan farklı bir habitada yolculuk eder. Bu göç sırasında balık tatlı suya, fizyolojik ve biyokimyasal açıdan, aklimasyon sağlar (Danulat,1995).

Arabacı ve ark. (2001), inci kefalinin Van Gölü'nden örneklenen bireylerinde serum iyon kompozisyonunun birçok deniz teleost türü ile benzerlik gösterdiğini ancak Na^+ konsantrasyonunun yüksek olduğunu belirlemişlerdir. İnci kefalinin tatlı suya göçü sırasında ise serum Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} ve P_i konsantrasyonlarının düştüğünü belirleyen araştırmacılar, inci kefalinin diğer balık türleri ile kıyaslandığında, ozmoregülasyon kapasitesinin yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Arihan ve ark. (2017), Van Gölü'ne fiziko-kimyasal açıdan benzerlik gösteren ve sodalı-tuzlu suya sahip olan Erçek Gölü'nde yaşayan inci kefalinin, bu göle dökülen Memedik Çayı'na göçü sırasında, eritrosit ozmotik frajilitesindeki değişimleri araştırmışlardır. Yapılan çalışmada, eritrosit ozmotik frajilitesinin tatlı su ortamında arttığını, bu artışın tatlı su ortamının fizikokimyasal özellikleri ile ilişkili olabileceğini ve göç sırasında balığın fizyolojik bir stres yaşadığını ileri sürmüşlerdir.

Ünal ve ark. (2001), inci kefalinde sindirim kanalının, ağız boşluğu, farinks, özafagus, post-özafageal şişkinlik ve bağırsak kısımlarından oluştuğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar balıkta sindirim kanalının duvarının histolojik olarak, epitel, submukoza, muskularis ve seroza tabakalarından meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Van gölünden avlanılan inci kefalinin sindirim kanalı içeriği analizleri, balığın yem organizması olarak, Ostracoda, Copepoda (*Diaptomus*), Cladocera (*Daphnia*), ve Chironomid larvaları, Corexidler, ergin böcekler (dipter), Plecoptera nimfleri ile beslendiğini göstermiştir. Karasu Çayı'nın ağzından yakalan bireylerin sindirim kanalında ise Cladocera (*Daphnia*), Chironomid larvaları, ergin böcekler, bitkisel ve hayvansal detritus tespit edilmiştir (Çetinkaya ve Öksüz, 1996).

İnci kefalinde sindirim sistemi ile ilgili geçmişte yapılmış olan az sayıda çalışma bulunmaktadır dolayısıyla bu alanda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, balığın tatlı suya göçü sırasında, özafagus ve bağırsak epitelindeki hücresel değişimlerin, apoptotik hücre ölümü ve hücre proliferasyonu ile araştırılması amaçlanmıştır. Bu şekilde bu dokuların balığın farklı bir ortama (tatlı su) geçişine verdiği hücresel yanıt hakkında, bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Alanı ve Balık Temini

Çalışmada toplam 18 adet, olgun dişi inci kefali (çatal boy: 18 – 21 cm ve total ağırlık: 80 – 110 g) kullanıldı. Balıklar Mayıs ayı içerisinde Van Gölü ve göle dökülen Karasu Çayı'ndan yakalandı. Balık örnekleme göç yolu üzerinde üç farklı noktadan, üç farklı zamanda yapıldı. İlk örnekleme 01.05.2018 tarihinde Van Gölü'nden, üreme öncesi dönemde, gerçekleştirildi. İkinci örnekleme, balığın göç ettiği Karasu Çayı'nın göle dökülen giriş bölgesinden, 05.05.2018 tarihinde yapıldı. Üçüncü örnekleme ise Karasu Çayı'nın, göle giriş yaptığı yerin yaklaşık olarak 6.5 km üst tarafında olan, bir bölgesinden yapıldı (Şekil 3.1.). Her örnekleme bölgesi için 6 adet balık kullanıldı. Örnekleme noktalarından alınan su örneklerinde aynı zamanda, pH ve sıcaklık ölçümü gerçekleştirildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar sırasıyla, Çizelge 3.1. ve Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Model
Rotary mikrotom	Microm GmbH	H315
Mikroskop	Leica	DMI 6100B
pH metre	Sartorius	PB-11
Manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR 3001
Vorteks	Heidolph	Reax Top QO4
Hassas terazi	Sartorius	ED 224S
Sterilizatör	Sanyo	MOV-212S
Buzdolabı	Beko	BK 9330 NF
Derin dondurucu	Beko	BK 7971 DF
Su banyosu	-	-

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasalların ve sarfların listesi

Kimyasal/Sarf	Marka	Katalog numarası
Formaldehit	Sigma-Aldrich	F1635
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	71640
NaH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	71496
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873
NaCl	Merck	1.06404
Tris	AppliChem	A2264
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Merck	1.08597
Mg ₂ SO ₄ solüsyonu (1 M)	AppliChem	A3890
Bovin serum albumin	Fluka	05471
2-Fenoksietanol	Fluka	77699
Ksilen	Merck	1.08681
Etanol (% 99.9)	Merck	1.00983
Ticari etanol (% 95)	Esvan Kimya	
Parafin	Merck	1.07337
Kanada balsamı	Merck	1.01691
Adhesiv lam (silan kaplı)	Histobond Marienfeld	08.100
Apoptoz kiti (In Situ Cell Death Detection Kit)	Abcam	ab206386
Primer antikor (Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear, clone PC10)	Dako	M0879
İmmunohistokimya kiti (Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit)	Abcam	Ab80436
DNaz-I	AppliChem	A3778



Şekil 3.1. Çalışma alanının haritası ve örnekleme noktaları (1: Van Gölü; 2: Karasu Çayı Girişi; 3: Karasu Çayı'nın üst tarafı) (Kaynak: Google Earth, Google Maps).

3.3. Doku Alımı ve Histolojik Prosedürler

Balıklardan dokuların alınımı, balığın strese girmesinin önlenmesi için, yakalandığı yerde yapıldı. Balıklar disekte edilmeden önce, fenoksietanol (320 μ l/l) ile anestezi edildi. Anestezi edilen balık, karın bölgesinden makas ile açıldıktan sonra, sindirim kanalının özafagus, ön bağırsak, orta bağırsak ve son bağırsak kısımları ince pens ve makas yardımı ile dikkatlice çıkartıldı. Çıkartılan dokular, % 10'luk nötral

tamponlu formaldehit fiksativ ile 24 saat tespit edildi. Tespit edilen dokular, fosfat tuz tamponu (PBS; 0.01 M, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra dereceli etanol (% 70, % 80, % 96 ve absölü) serilerinden geçirilerek, dehidrate edildi. Dokular daha sonra ksilende şeffaflaştırılarak parafine gömüldü. Parafine gömülmüş olan dokulardan rotary mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlerde daha sonra TUNEL ve PCNA boyamaları yapıldı. Çalışma boyunca Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde yer alan etik ilkelere riayet edildi.

3.4. TUNEL Boyama

Özafagusun orta kısmından ve bağırsağın ön, orta ve son bölümlerinden alınan kesitlerde apoptotik hücrelerin (parçalı DNA'ya sahip olan) işaretlenmesi için TUNEL yöntemi kullanıldı. TUNEL boyaması, ticari bir kit (Çizelge 3.2) kullanılarak ve bu kitin protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Dokulardan alınan kesitler (5 µm) silan kaplı adhesiv lamlara aktarıldıktan sonra, deparafinize ve rehidrate edildi. Kesitler daha sonra TBS (20 mM Tris 140 mM NaCl, pH: 7.6) ile yıkandı ve proteinaz K (10 mM Tris içinde 2 mg/ml, pH: 8.0) ile oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilerek dokunun permeabilizasyonu sağlandı. TBS ile yıkanan kesitler, metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkamadan sonra kesitler, TdT tamponu ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Kesitler daha sonra TBS ile yıkanmaksızın, biyotin ile işaretlenmiş deoksinükleotid ve enzim (TdT) karışımı (1 µl enzim + 39 µl TdT tamponu) ile 37 °C'de ve nemli ortamda 90 dk boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, doku kesitleri durdurma (stop) tamponu ile muamele edilerek reaksiyon durduruldu. TBS ile yıkamanın ardından kesitler, bloke edici tampon ile 10 dk. inkübe edildi. Kesitlerden bloke edici tampon uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine sulandırılmış konjugat karışımı (4 µl 25× konjugat ve 96 µl blok edici tampon) damlatıldı ve kesitler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra, DAB solüsyonu ile muamele edilerek, kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar beklendi. Daha sonra lamalar distile su ile yıkandı ve sonrasında % 0.3'lük metil yeşili ile zemin boyaması yapıldı. Son olarak kesitler, etanol ve ksilol serilerinden geçirildi ve Kanada balsamı ile kapatıldı. Boyama, pozitif ve negatif

kontrol boyamaları ile test edildi. Pozitif kontrol boyamasında kesitler, proteinaz K uygulamasından sonra, DNaz I (TBS ile hazırlanan 1mM MgSO₄ içinde) ile inkübe edildi (oda sıcaklığında 20 dk). Negatif kontrol boyamasında ise, işaretleme karışımına TdT enziminin yerine bidistile su konuldu. Diğer basamaklar her iki kontrol kesitinde yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Preparatlar, mikroskop (Leica DMI 6000B model) ile incelenerek görüntüleri alındı.

3.5. PCNA İmmun Boyaması

Özafagusun orta kısmından ve bağırsağın ön, orta ve son bölümlerinden alınan kesitlerde proliferen olan hücreler, PCNA'nın immunohistokimyasal olarak boyanması ile işaretlendi. Kesitler, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, metanol ile hazırlanan % 3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkanan kesitler, immunohistokimya kiti içerisinde sağlanan protein bloke edici solüsyon ile 10 dk muamele edildi. Bu sırada primer antikor (Çizelge 3.2), içinde % 1 oranında sığır serum albumin bulunan TBS ile 1:200 oranında sulandırıldı. Hazırlanan primer antikor, lamaların TBS ile yıkanmasından sonra, kesitlere uygulandı. Primer antikor uygulanan kesitler, 4 °C'de 24 saat boyunca nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki aşamalar, immunohistokimya kiti (Çizelge 3.2) protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Primer antikor uygulamasından sonra kesitler, TBS ile yıkandı ve komplement ile 10 dk inkübe edildi. TBS ile tekrar yıkanan kesitlere bu kez HRP-konjugat uygulandı. HRP-konjugat ile 15 dk inkübe edilen kesitler, TBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojen ile muamele edildi ve kesitler kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar (1-3 dk) bu solüsyonda bekletildi. Zemin boyaması Mayer'in hematoksilen boyası ile yapıldı. Lamalar dereceli etanolden (%95, %100) ve ksilenden geçirilerek Kanada balsamı ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerinde, primer antikor yerine TBS kondu. Preparatlar mikroskop ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.6. Hücre Sayımı

Özafagus, ön bağırsak, orta bağırsak ve son bağırsak dokularından alınan ve TUNEL/PCNA ile boyanan kesitlerde apoptotik ve proliferan hücrelerin kantifikasyonu, Kaptaner ve Kankaya (2013) ve Sirri ve ark. (2014)'rından bazı modifiyeler yapılarak, gerçekleştirildi. Her bir kesitte özafagus ve bağırsağı örtem epitel dokusunun 5 farklı bölgesinden, mikroskop ile bağlantılı bir kamera (Leica DFC490, Leica Microsystems) kullanılarak, 20× büyütmede fotoğraflar çekildi. Çekilen fotoğraflar, <https://imagej.nih.gov/ij/download.html> internet adresinden serbest olarak indirilebilen, ImageJ 1.46 yazılımına aktarıldı. Daha sonra bu yazılımın hücre sayıcı eklentisi (cell counter plugin) kullanılarak, 5 farklı epitel sahasında, TUNEL/PCNA pozitif ve negative hücrelerin sayımı yapıldı. Özafagus dokusu için her bir kesitte en az 1000 hücrenin, bağırsak dokularında ise her bir kesitte en az 2000 hücrenin sayımı yapıldı. Sayımın yapıldığı epitel alanları için apoptotik indeks (AI) ve proliferasyon indeksi (PI) değerleri, aşağıda verilen eşitliklere göre, hesaplandı ve beş farklı alandan elde edilen indeks değerlerinin ortalamaları alındıktan sonra, bireyin ilgili dokusuna ait olan AI ve PI değerleri elde edildi (3.6.1 ve 3.6.2). Elde edilen veriler, istatistiksel analizler için kullanıldı.

$$AI = \left[\frac{\text{Alanda sayılan TUNEL pozitif hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı (negative + pozitif)}} \right] \times 100 \quad (3.6.1)$$

$$PI = \left[\frac{\text{Alanda sayılan PCNA pozitif hücre sayısı}}{\text{Toplam hücre sayısı (negative + pozitif)}} \right] \times 100 \quad (3.6.2)$$

3.7. İstatistiksel Analizler

Apoptotik indeks ve proliferasyon indeksi değerlerinden elde edilen veriler, Windows için SPSS 16.0 istatistik paket programında, varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edildi. Farklı örnekleme bölgelerinden her doku için elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde post hoc Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu ve istatistiksel önem derecesi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada ölçülen ve geçmişte yapılmış olan bazı çalışmalarda bildirilen, Van Gölü ve Karasu Çayı sularına ait fiziko-kimyasal bulgular, Çizelge 4.1'de sunulmuştur. Çizelgede de görüldüğü gibi, göl suyu çay suyuna göre, pH, salinite, iletkenlik ve iyon konsantrasyonları açısından önemli farklılıklar göstermektedir.

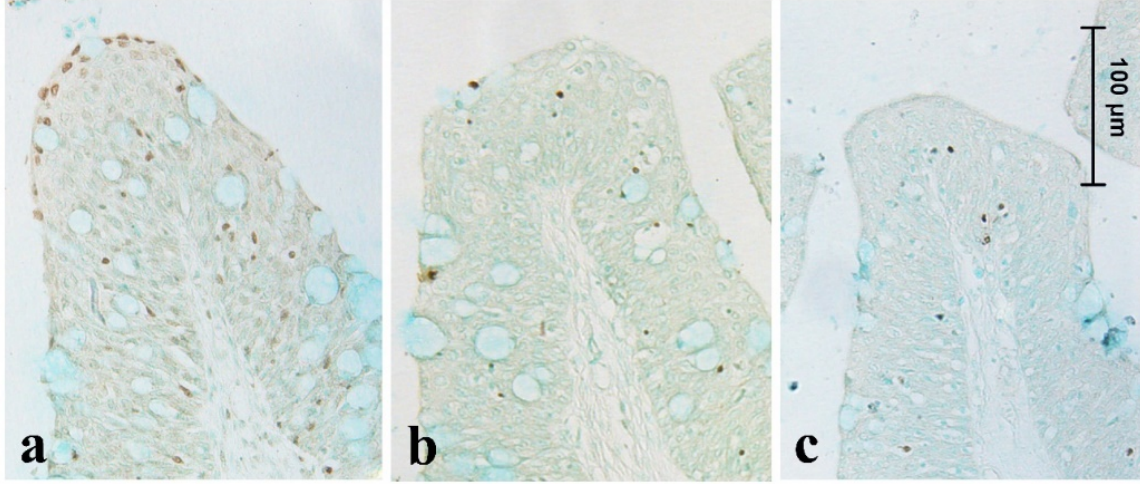
Çizelge 4.1. Van Gölü suyu ve Karasu Çayı suyunun fiziko-kimyasal özellikleri

Özellik	Van Gölü suyu	Karasu Çayı suyu
pH	9.81 ^{a,b} ; 9.78 ^c ; 9.65 ^f ; 9.77–9.80 ^g ; 9.64 ⁱ	8.63–8.65 ^c ; 7.40 ^d ; 8.28 ^e ; 8.34 ^g ; 8.40 ^h (Mayıs verisi); 8.31–8.38 ⁱ
Salinite	22.7 (‰) ^a ; 22.7 (ppt) ^b ; 15.0 (‰) ^e ; 16.90 (ppt) ^f ; 16.5–16.8 (ppt) ^g	0.3 (ppt) ^g
İletkenlik	25.5–26.5 (mS × cm ²) ^a ; 29.76 (mS/cm) ^f ; 27.88–28.65 (mS/cm) ^g	572 (µS/cm) ^g ; 582.2 (µS/cm) ^h (Mayıs verisi)
Çözünmüş oksijen	10.2 (mg/ml) ^f ; 10.4–9.8 (mg/ml) ^g	8.7 (mg/ml) ^g ; 8.2–8.6 (Mayıs verisi) (mg/ml) ^c ; 8.8 (mg/ml) ^h
Sıcaklık	12.5 (°C) ⁱ	17.3–18.6 (°C) ⁱ
Doygunluk	107 (%) ^f ; 105–108 (%) ^g	100 (%) ^g ; 105 (%) ^h
<i>İyon konsantrasyonları</i>		
Na ⁺	336.9 (meq/l) ^d ; 337.9 (mmol/l) ^b	1.32 (meq/l) ^d ; 15–25 (mg/l) ^c
K ⁺	13.0 (meq/l) ^d ; 10.90 (mmol/l) ^b	0.103 (meq/l) ^d ; 2.5–4.0 (mg/l) ^c
Mg ²⁺	7.80 (meq/l) ^d ; 4.42 (mmol/l) ^b	2.01 (meq/l) ^d ; 64.41–70.47 (mg/l) ^c ; 83.3 (mg/l) ^h (Mayıs verisi)
Ca ²⁺	0.23 (meq/l) ^d ; 0.11 (mmol/l) ^b	1.01 (meq/l) ^d ; 84.21–93.0 (mg/l) ^c ; 98.4 (mg/l) ^h (Mayıs)
Cl ⁻	153.70 (meq/l) ^d ; 160.60 (mmol/l) ^b	0.37 (meq/l) ^d ; 17.80–21.30 (mg/l) ^c ; (27.7 mg/l) ^h
Total katyon	358.17 (meq/l) ^d	4.44 (meq/l) ^d
Total anyon	354.94 (meq/l) ^d	6.03 (meq/l) ^d

a: Danulat ve Selcuk (1992); b: Danulat (1995); c: Çetinkaya ve ark., (1994); d: Kempe ve ark., (1978) ve Tugrul ve ark., (1984)'nın bildirdiklerine göre Arabacı ve ark., (2001); e: Arabacı ve ark., (2001); f: Kaptaner (2015); g: Kaptaner ve ark., (2016); h: Atici ve ark., 2018; i: Bu çalışma

Çekirdeklerinde kırık DNA uçları içeren apoptotik hücreler, TUNEL boyamasından sonra, yoğun kahverengi bir görünüm sergilemişlerdir. Apoptotik hücrelerin, çok katlı olan ve mukus hücrelerini içeren, özafagus epitelinde, bazal tabakadan süperfisyal tabakaya kadar bütün tabakalarda rastgele dağılım gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4.1a). Karasu Çayı girişinden ve bu çayın üst tarafından örneklenen

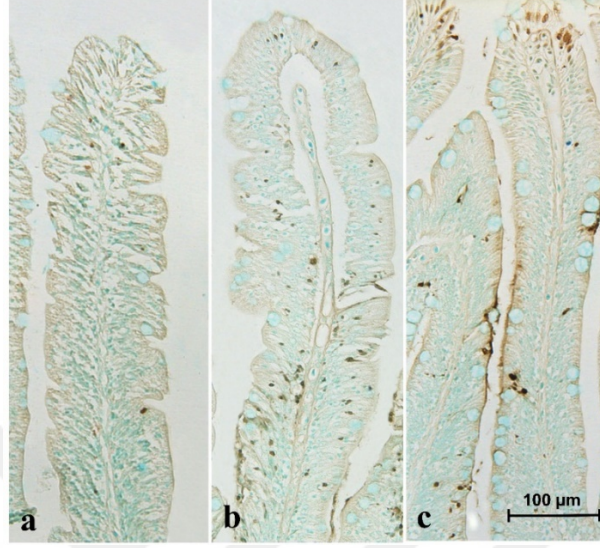
bireylerde özafagus epitelinin yine çok katlı olduğu ve mukus hücrelerini ihtiva ettiği belirlendi. Apoptotik hücrelerin özafagus epitelindeki dağılımının Van Gölü'nden örneklenen bireylerdekine benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1b,c) Karasu Çayı'ndan örneklenen bireylerin özafagus epitelindeki apoptotik indeks (AI) değerlerinin, Van Gölü'den örneklenen bireylerdekine kıyasla, önemli bir farklılık göstermediği bulundu (Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. TUNEL yöntemi ile boyanan özafagus kesitlerinde apoptotik epitel hücreleri. Çok katlı olan ve mukus hücresi içeren özafagus epitelinde TUNEL-pozitif hücreler, kahverengi görünmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi; c: Karasu Çayı üst tarafı).

Apoptotik hücrelerin, Van Gölü'nden örneklenen bireylerin bağırsağında, villus boyunca (villus bazalinden apeksine kadar) rastgele ve seyrek dağıldıkları belirlendi (Şekil 4.2a). Bununla birlikte Karasu Çayı'ndan örneklenen bireylerde apoptotik hücrelerin, villus epiteli boyunca arttığı (Şekil 4.2b) ve bazı bireylerde villusların uç kısımlarında yoğunlaştığı, gözlemlendi (Şekil 4.2c). AI'nin, Karasu Çayı'nın girişinden örneklenen bireylerin bağırsaklarının ön ve orta kısımlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği tespit edildi ($P < 0.05$) ancak bağırsağın arka kısmında değişmediği gözlemlendi. AI'nin Van Gölü'nden örneklenen bireylerin bağırsağına kıyasla, bağırsağın tamamında anlamlı bir şekilde yüksek olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$). Çayın üst tarafından örneklenen bireylerde bağırsağın ön, orta, son kısımlarındaki ve bağırsağın tamamındaki AI değerlerinin, girişten örneklenen bireylerin değerleri ile benzerlik

gösterdiği gözlemlendi ve istatistiksel önem farklılıklarının da yine çayın girişinden örneklenen bireylerdeki şekilde olduğu belirlendi (Çizelge 4.2).

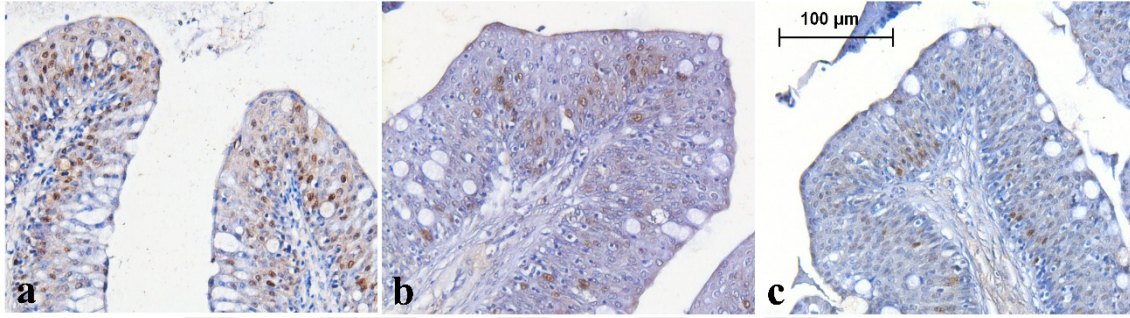


Şekil 4.2. Van Gölü (a), Karasu Çayı girişi (b) ve Karasu Çayı üst tarafından (c) yakalanan inci kefalı bağırsak villus epitelinde apoptotik (TUNEL-pozitif) hücreler.

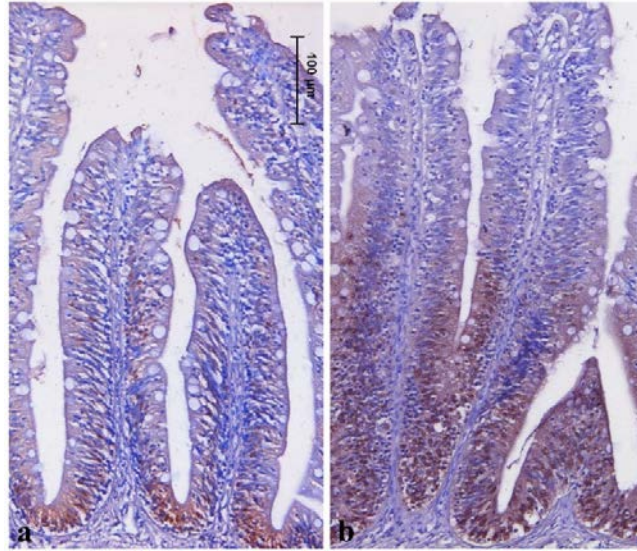
PCNA immun boyaması sonucunda proliferen olan epitel hücreleri, kahverengine boyandı. Prolifere olan hücrelerin, özafagus epitelinde bazaldan üst katmana doğru rastgele dağılım gösterdikleri ve epitel boyunca dağıldıkları gözlemlendi. Bu hücrelerin yoğunluğunun çaydan örneklenen bireylerin özafagus epitelinde daha az olduğu belirlendi (Şekil 4.3a,b,c). Proliferasyon indeksi (PI)'nin Karasu Çayı girişinden örneklenen bireylerin özafagusunda anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ($P < 0.05$). PI değerindeki azalma, Karasu Çayı'nın üst tarafından örneklenen bireylerin özafagus epitelinde de gözlemlendi ve bu azalmanın hem gölden hem de çay girişinden örneklenen bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($P < 0.05$).

PCNA-pozitif hücrelerin bağırsakta çoğunlukla villusların bazal kısmını ve iki villus arasındaki çukur kısımları örten epitel bölgelerinde yoğunlaştıkları, az da olsa villusun üst tarafını örten epitelde rastgele dağılım gösterdikleri tespit edildi. PCNA-pozitif hücrelerin, Karasu Çayı'nın girişinden yakalanan bireylerin ön bağırsak kısmında villus bazalinden apeksine doğru fazlalığı gözlemlendi (Şekil 4.4). Proliferasyon indeksi (PI)'nin çay girişinden örneklenen balıkların ön bağırsak bölümünde, istatistiksel olarak, yüksek olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Bu alandan

örneklenen balıkların diğer bağırsak kısımlarına ait PI değerlerinde yükselmeler gözlenmesine rağmen, bunların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ancak bağırsağın bütün kısımlarından elde edilen istatistiksel veriler, PI değerinin çay girişinde göle kıyasla yüksek olduğunu göstermiştir ($P < 0.05$) (Çizelge 4.3). PI'nin, Karasu Çayı'nın üst tarafından yakalanan balıkların ön, orta ve arka bağırsak kısımlarında ve bağırsağın tamamında değişmediği belirlenmiştir (Çizelge 4.3.).



Şekil 4.3. PCNA immün boyanması yapılan özofagus kesitlerinde proliferen epitel hücreleri. Çok katlı olan ve mukus hücresi içeren epiteldeki PCNA-pozitif hücreler, kahverengi görünmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi; c: Karasu Çayı üst tarafı).



Şekil 4.4. PCNA immün boyanması yapılan bağırsak kesitlerinde, villus epitelinde lokalize olan PCNA pozitif hücrelerin görüntüsü. Görüntüde, PCNA-pozitif hücrelerin, villusun bazal bölgesini ve villuslar arasındaki çukur bölgeleri örten epitelde lokalize olduğu görülmektedir (a: Van Gölü; b: Karasu Çayı girişi). Çay girişinden örneklenen bireylerde, proliferen epitel hücrelerinin, villusun bazalinden apeksine doğru yoğunlaşarak arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. İnci kefalinin anadrom göçü sırasında, Van Gölü, Karasu Çayı girişi ve Karasu Çayı üst tarafından örneklenen bireylerin özafagus ve bağırsak (ön, orta, son ve incelenen bütün bölümler) epitelinde apoptotik indeks değerleri

Örnekleme Bölgesi ve Örnek Sayısı	Örnekleme tarihi	Özafagus	Ön bağırsak	Orta bağırsak	Son bağırsak	İncelenen bağırsak bölümlerinin tamamı
Van Gölü, 6	01.05.2018	15.65 ± 9.98 ^a	7.08 ± 1.30 ^a	7.82 ± 3.36 ^a	12.05 ± 3.62 ^a	8.98 ± 3.57 ^a
Karasu Çayı Girişi, 6	05.05.2018	16.95 ± 9.04 ^a	13.56 ± 7.37 ^b	12.83 ± 4.25 ^{ab}	12.98 ± 4.94 ^a	13.12 ± 5.34 ^b
Karasu Çayı üst kısım, 6	12.05.2018	15.20 ± 3.96 ^a	13.00 ± 4.24 ^{ab}	16.41 ± 9.77 ^c	11.48 ± 3.46 ^a	13.63 ± 6.43 ^b

Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, istatistiksel önem farkını göstermektedir (sütunlar arası karşılaştırma). İstatistiksel önem derecesi, P < 0.05 olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.3. İnci kefalinin anadrom göçü sırasında, Van Gölü, Karasu Çayı girişi ve Karasu Çayı üst tarafından örneklenen bireylerin özafagus ve bağırsak (ön, orta, son ve incelenen bütün bölümler) epitelinde proliferasyon indeksi değerleri

Örnekleme Bölgesi ve Örnek Sayısı	Örnekleme tarihi	Özafagus	Ön bağırsak	Orta bağırsak	Son bağırsak	İncelenen bağırsak bölümlerinin tamamı
Van Gölü, 6	01.05.2018	56.18 ± 10.49 ^a	17.84 ± 4.57 ^a	14.65 ± 1.68 ^a	14.65 ± 4.97 ^a	16.37 ± 4.79 ^a
Karasu Çayı Girişi, 6	05.05.2018	37.09 ± 8.34 ^b	33.36 ± 8.08 ^b	15.55 ± 2.64 ^a	17.43 ± 9.03 ^a	23.23 ± 10.23 ^b
Karasu Çayı üst kısım, 6	12.05.2018	20.42 ± 8.45 ^c	16.30 ± 6.55 ^a	12.92 ± 1.81 ^a	10.63 ± 2.87 ^a	12.50 ± 5.25 ^a

Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan değerler üzerindeki farklı üst simgeler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, istatistiksel önem farkını göstermektedir (sütunlar arası karşılaştırma). İstatistiksel önem derecesi, P < 0.05 olarak kabul edilmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, inci kefalinin Van Gölü'nün alkali ve tuzlu suyundan tatlı suya göçü sırasında, sindirim kanalının özafagus ve bağırsak bölümlerini örten epitel tabakasında, apoptoz ve hücre proliferasyonundaki değişimler araştırıldı. Çalışmadan elde edilen bulgular, özafagus ve bağırsak epitelinin apoptoz ve hücre proliferasyonu açısından farklı yanıtlar verdiklerini gösterdi.

Özafagus yılan balığı (*Anguilla anguilla*)'nda önemli bir osmoregülasyon organıdır. Yılan balığının deniz suyuna uyum sağlamış olanlarında, özafagus epitelinin tek katlı veya silindirik epitelten meydana geldiği ve mukus hücrelerini içerdiği, tatlı suya uyum sağlayanlarında ise çok katlı epitelten oluştuğu ve mukus hücresi içermediği gözlenmiştir. Epiteldeki bu değişimlerin, iyon ve su geçirgenliğindeki değişimler ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Yamamoto ve Hirano, 1978). Apoptotik hücreler örihalin bir tür olan Mozambik tilapyası (*Oreochromis niloticus*)'nın özafagus epitelinde, tatlı suya uyum sonrasında az miktarda gözlenirken, deniz suyuna uyum sağlamış olanlarda, epitel kıvrımlarının uç bölgelerinde ve daha fazla miktarda gözlenmiştir. Deniz suyuna uyum sağlamış olan tilapyalarda proliferen hücrelerin özafagus epitelinde az miktarda ve kıvrımların uç bölgelerinde lokalize oldukları, tatlı suya uyum sağlamış olanlarda ise çok sayıda ve dağınık dağılım gösterdikleri bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2007). Bu çalışmada diğer örihalin türlerden farklı olarak, tatlı sudan yakalanan bireylerin özafagus epitelinin, göl ortamındakilerde olduğu gibi, çok katlı olduğu gözlemlendi. Öte yandan, tatlı su ortamında özafagus epiteli boyunca apoptotik hücreler bulunduğu halde, AI değerlerinde önemli değişimlerin meydana gelmediği belirlendi. Prolifere olan hücrelerin ise epitel boyunca tespit edildiği ancak sayılarının tatlı su ortamında dereceli olarak azaldığı, bulundu. Elde edilen bulgular, inci kefalinin özafagusunda tatlı suya uyum esnasında belirlenen histolojik ve hücresel bulguların, çevresel tuzluluk değişimlerine aklimasyon sağlayabilen diğer örihalin balık türlerdekinden farklı olduğunu göstermektedir. Bu gözlemlere dayanarak, özafagusun bu balıkta osmoregülasyon süreçlerinde önemli bir fonksiyon göstermediği söylenilebilir. Çalışmadan elde edilen bulgular ayrıca özafagusun aklimasyon süreçleri

sırasında oynadığı rolün, örihalin türler arasında farklılık gösterebileceğini de önermektedir.

Apoptotik hücrelerin bağırsak villuslarında epitel boyunca dağıldıkları, proliferen olan epitel hücrelerinin ise daha çok bazal bölgede lokalize oldukları gözlemlendi. Apoptotik hücrelerin intestinal epiteldeki benzer dağılımları, farklı çalışmalarda da rapor edilmiştir (Takahashi ve ark., 2006a; Takahashi ve ark., 2006b). Bununla birlikte apoptotik hücrelerin, çaydan örneklenen bireylerin bazılarında, villusların apeks bölgesini döşeyen epitelde lokalize oldukları gözlemlendi. Bu tarz bir durumun çamur zıpzıpı (*Periophthalmus modestus*)’nda, tatlı suya uyum sırasında düşük permeabilite ile ilişkili olarak, meydana geldiği bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2006b). Prolifere olan epitel hücrelerinin, çekic kafa köpek balığı (*Sphyrna lewini*) ve dil balığı (*Solea solea*)’nda bu çalışmadaki gözlemler ile uyumlu olarak, villusun bazal bölgesinde yerleşim gösterdikleri belirlenmiştir (Sirri ve ark., 2014; Takahashi ve ark., 2014).

Bu çalışmada AI’nin, Karasu Çayı’ndan örneklenen bireylerin bağırsağının ön kısmında, orta kısmında ve bağırsak epitelinin genelinde, Van Gölü’nden örneklenen bireylere kıyasla, yüksek olduğu belirlendi. PI’nin de çay girişinden örneklenen bireylerin ön bağırsağında ve bağırsağın genelinde, hem göle hem de çayın üst kısmına göre, yüksek olduğu bulundu. Teleostlarda bağırsaktaki hücre dönüşümünün, osmoregülasyonda rol oynayan hormonların kontrolü altında olduğu bildirilmiştir (Takahashi ve ark., 2006b; McCormick, 2011). Prolaktin teleostlarda tatlı suya aklimasyonu uyaran esansiyel bir hormondur. Bu hormon fonksiyonunu, gastrointestinal yoldan NaCl ve su emilimini azaltarak gerçekleştirir (Hirano, 1986). Büyüme hormonu ise deniz suyuna aklimasyonda rol oynar. Diğer bir hormon kortizol, hem prolaktin hem de büyüme hormonu ile etkileşerek, osmoregülasyonda ikili bir fonksiyon görür. Kortizol balığın tatlı suya uyumunu, iyon taşıyıcılarının ve klorid hücrelerini sürekliliğini sağlayarak, gerçekleştirir (McCormick, 2001). Çamur zıpzıpı (*Periophthalmus modestus*)’nın tatlı suya uyumu sırasında prolaktin enjekte edilmesi, kortizol ile sinerjistik olarak, intestinal epiteldeki hücre proliferasyonunu uyarmıştır bununla birlikte kortizolün intestinal epiteldeki ve bağ dokusundaki apoptozu önemli bir şekilde yükselttiği, gözlenmiştir. Çamur zıpzıpının intestinal epitelinde hormonal etkiler ile düzenlenen bu hücresel değişimlerin, bağırsakta düşük permeabilite ile ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Takahashi ve ark., 2006b). Dolayısıyla, inci kefalinin

intestinal epitelinde apoptoz ve hücre proliferasyonunda tatlı su ortamında gözlenen artışlar (bu çalışmada prolaktin ve kortizolün plazmadaki düzeylerinin ölçümü gerçekleştirilmemiş olsa da) bu iki hormonun seviyesindeki muhtemel artışlardan kaynaklanabilir. Elde edilen bulgular inci kefalinde bağırsağın tatlı suya aklimasyonda, rolünün olabileceğini ortaya koymaktadır.

Osmoregülasyon, türler arasında ayırım yapılmaksızın, enerji gerektiren bir süreçtir. Seyreltik deniz suyuna maruz bırakılma sonucunda hipo-ozmotik stres yaşayan Akdeniz mavi yengeci (*Carcinus aestuarii*)'nde, reaktif oksijen türlerinin ve enerji maliyetlerinin yükseldiği, bildirilmiştir (Rivera-Ingraham ve ark., 2016). Osmoregülasyon süreçlerin, Mersin balığı (*Acipenser naccarii*)'nin dokularında oksidatif stresi artırdığı ve balığın fizyolojisinde önemli değişimlere sebep olduğu rapor edilmiştir (Martinez-Alvarez ve ark., 2002). Öte yandan, midye (*Perna sp.*)'lerde yapılan çalışmalar üreme sezonunda, artan metabolizmanın bir sonucu olarak, bağırsak bezlerinde oksidatif stresin arttığını göstermiştir (Filho et al., 2001; Verlecar et al., 2008). Hücresel redoks potansiyeli intestinal epitelde hücre proliferasyonunu düzenler ve hücrede redoks dengesinin oksidatif yöne kayması, intestinal epitelde meydana gelen apoptozu tetikler (Aw ve ark., 2003). İnci kefalinde yapılan bir çalışmada, fizyolojik bir stres göstergesi olan eritrosit ozmotik frajilitesinin, tatlı su ortamında arttığı gözlenmiş ve bu artışın tatlı su ortamının fizikokimyasal özellikleri ile ilişkili olduğu, ileri sürülmüştür (Arihan ve ark., 2018). Yapılan başka bir çalışmada ise tatlı su ortamından yakalanan inci kefalinin ön bağırsak dokusunda, antioksidan yanıtların ve oksidatif stresin meydana geldiği, belirlenmiştir (Kaptaner ve Dogan, 2018). Dolayısıyla inci kefalinin bağırsak epitelinde belirlenen hücresel değişimlerin altında, tatlı suya uyum sırasında meydana gelen oksidatif süreçler de yatıyor olabilir.

Çekiç kafa köpek balığı (*Sphyrna lewini*) intestinal epitelinde apoptozun, aç bırakılma sonrasında azaldığı, yeniden beslenme sonrasında ise arttığı bildirilmiştir. Aç bırakılan çekiç kafa köpek balıklarının intestinal epitelinde hücre proliferasyonunun azaldığı ve yeniden beslenme sonrasında ise fazlaştığı gözlenmiştir (Takahashi ve ark., 2014). Dolayısıyla, balıkların intestinal epitelinde meydana gelen apoptoz ve hücre proliferasyonu, beslenme durumu ile de ilişkilidir. Bu nedenle inci kefalinin bağırsak epitelindeki hücresel değişim, tatlı sudaki beslenme durumu ile de ilişki olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, inci kefalinin alkali-tuzlu sudan tatlı suya geçişinden sonra, özafagus ve bağırsak epitelinde hücresel yanıtların meydana geldiği, apoptoz ve hücre proliferasyonu ile gösterildi. Bu geçiş sonrasında, özellikle bağırsak epitelinde meydana gelen değişimler, tatlı suya uyum için gerekli olan osmoregülasyon sürecini kontrol eden hormonal mekanizmalar ve oksidatif süreçlerden kaynaklanabilir. İncelenen dokuların epitelindeki hücresel değişimlerin altında yatan sebeplerin, iyi veya net bir şekilde, anlaşılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, **7** (5): 363–368.
- Arabacı, M., Çağırğan, H., Sarı, M., Şekeroğlu, R., 2001. Serum ionic content of endemic *Chalcalburnus tarichi* during spawning, prespawning and postspawning terms, living in highly alkaline waters of lake Van (pH 9.8), Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **1** (2): 53-57.
- Arihan, O., Kaptaner, B., Kankaya, E., 2017. Erythrocyte fragility in pearl mullet (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814) during migration from highly alkaline water to freshwater. *Fresenius Environmental Bulletin*, **26** (3): 2325-2329.
- Atici, A., Elp, M., Şen, F., 2018. The effects of sand pits and sand extractions region on Karasu stream (Van) to water quality criteria. *Fresenius Environmental Bulletin*, **27** (10): 6583-6590.
- Aw, T. Y., 2003. Cellular redox a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *News in Physiological Sciences*, **18** (5): 201-204.
- Binde, T. R., Cooke, S. J., Hinch S. G., 2011. The Biology of Fish Migration. In: Farrell A.P., (ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, volume 3, pp. 1921–1927. San Diego: Academic Press.
- Buddington, R., Kuz'mina, K. V., 2000. Digestive system. *The Laboratory Fish* (Editor: G.K. Ostrander). Academic Press, San Diego. 379 - 383.
- Casasco, A., Giordano, M., Danova, M., Casasco, M., Cornaglia, A. I., Calligaro, A., 1993. PC10 Monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues: a combined immunocytochemical and flow cytometric study. *Histochemistry*, **99** (3): 191-199.
- Cataldi, E., Crosetti, D., Leoni, C., Cataudella, S., 1988. Oesophagus structure during adaptation to salinity in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Pisces) juveniles. *Italian Journal of Zoology*, **55** (1-4): 59-62.
- Çetinkaya, O., Öksüz, A., 1996. Van inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas, 1811)'in populasyon yapısı, beslenme, üreme özellikleri ve avcılığı. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, **6**: 1-15.
- Çetinkaya, O., Sarı, M., Şen, F., Arabacı, Duyar, M. H. A., 1994. Limnological characteristics of Karasu river inflowing lake Van. *Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences*, **4** (1): 151-168.
- Ciccotti, B. E., Macchi, E., Rossi, A., Cataldi, E., Cataudella, S., 1993. Glass eel (*Anguilla anguilla*) acclimation to freshwater and seawater: morphological changes of the digestive tract. *Journal of Applied Ichthyology*, **9** (2): 74-81.
- Costantini, D., 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters*, **11** (11): 1238–1251.
- Danulat, E., Selcuk, B., 1992. Life history and environmental conditions of the anadromous *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) in the highly alkaline lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. *Archiv für Hydrobiologie*, **126**: 105–125.
- Danulat, E., 1995. Biochemical-physiological adaptations of teleosts to highly alkaline, saline lakes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. **5**, pp. 229–249, Elsevier.

- Ferrando, S., Ferrando, T., Girosi, L., Mauceri, A., Fasulo, S., Tagliafierro, G., 2009. Apoptosis, cell proliferation and serotonin immunoreactivity in gut of *Liza aurata* from natural heavy metal polluted environments: preliminary observations. *European Journal of Histochemistry*, **49** (4): 331–340.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A., 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, **119**: 493-501.
- Hirano, T., 1986. The spectrum of prolactin action in teleosts. *Progress in Clinical and Biological Research*, **205**: 53–74.
- Kaptaner, B., Kankaya, E., 2013. Analysis of germ cell proliferation, apoptosis, and androgenesis in the Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichi*) during testicular development. *Fish Physiology and Biochemistry*, **39**: 1165–1679.
- Kaptaner, B., 2015. Relation between increased oxidative stress and histological abnormalities in the ovaries of *Alburnus tarichi* in Lake Van, Turkey. *Environmental Monitoring Assessment*, **187** (11): 702.
- Kaptaner, B., Doğan, A., 2018. Status of the tissue antioxidant system in *Alburnus tarichi* during anadromous migration. *International Conference of Food, Agriculture and Animal Sciences*, 3-7 October 2018, Antalya - Turkey. 110.
- Kaptaner, B., Kankaya, E., Doğan, A., Durmuş, A., 2016. Histological alterations and oxidative stress in the testes of the pearl mullet (*Alburnus tarichi*) in Lake Van, Turkey. *Environmental Monitoring Assessment*, **187** (11): 702.
- Kempe, S., Khoo, F., Gurleyik, Y., 1978. Hydrography of lake Van and its drainage area. E. T. Degens and F. Kurtman, *The Geology of Lake Van*. M.T.A., No:169, Ankara, 158 pp.
- Kipanyula, M. J., Maina, K. W., 2016. Morphological and adaptational changes associated with fish migration from fresh to marine water bodies. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **4** (4): 125-129.
- Kirsch, R., Meister, M. F., 1982. Progressive processing of ingested water in the gut of sea water Teleosts. *Journal of Experimental Biology*, **98**: 67-81.
- Kirsch, R., Humbert, W., Rodeau, J.L., (1984) Control of the blood osmolarity in fishes, with references to the functional anatomy of the t. *Osmoregulation in Estuarine and Marine Animals*, pp. 67-92. Ed. by A. Pequeux, R. GiKs and A. Bolis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- Kylarová, D., Procházková, J., Madarová, J., Bartoš, J., Lichnovsky, V., 2002. Comparison of the TUNEL, Lamin B and Annexin V Methods for the Detection of Apoptosis by Flow Cytometry. *Acta Histochemica*, **104**: 367–370.
- Martinez-Alvarez, R. M., Hidalgo, M. C., Domezain, A., Morales, A. E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *Journal of Experimental Biology*, **205** (23): 3699–706.
- McCormick, S. D., 2011. The hormonal control of osmoregulation in teleost fish. In: Farrell A.P., (ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, volume 2, pp. 1466–1473. San Diego: Academic Press.
- McCormick, S. D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, **41** (4): 781-794.
- Meister, M. F., Humbert, W., Kirsch, R., Vivien-Roels, B., 1983. Structure and ultrastructure of the oesophagus in sea-water and fresh-water teleosts (Pisces). *Zoomorphology*, **102** (1): 33-51.

- Obande, R. A., Dambo, A., Adah, P. M., 2014. Migration in fishes: a review. *Nigerian Journal of Fisheries and Aquaculture*, **2**(1): 1 – 5
- Rivera-Ingraham, G. A., Barri, K., Boël, M., Farcy, E., Charles, A. L., Geny, B., Lignot, J. H., 2016. Osmoregulation and salinity-induced oxidative stress: is oxidative adaptation determined by gill function? *Journal of Experimental Biology*, **219**: 80–89.
- Schwartzman, R. A., Cidlowski, J. A., 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*, **14**: 133-151.
- Sirri, R., Bianco, C., De Vico, G., Carella, F., Bonaldo, A., Sarli, G., Tondini, G., Mandrioli, L., 2014. Proliferation, apoptosis, and fractal dimension analysis for the quantification of intestinal trophism in sole (*Solea solea*) fed mussel meal diets. *BMC Veterinary Research*, **10** (1): 148.
- Takahashi, H., Hyodo, S., Abe, T., Takagi, C., Grau, G. E., Sakamoto, T., 2014. Effects of fasting and refeeding on intestinal cell proliferation and apoptosis in hammerhead shark (*Sphyrna lewini*). *Journal of Coastal Life Medicine*, **2** (4): 253-258.
- Takahashi, H., Prunet, P., Kitahashi, T., Kajimura, S., Hirano, T., Grau, E. G., Sakamoto, T., 2007. Prolactin receptor and proliferating/apoptotic cells in esophagus of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and in seawater. *General and Comparative Endocrinology*, **152** (2-3): 326-331.
- Takahashi, H., Sakamoto, T., Narita, K., 2006a. Cell proliferation and apoptosis in the anterior intestine of an amphibious, euryhaline mudskipper (*Periophthalmus modestus*). *Journal of Comparative Physiology B*, **176** (5): 463–468.
- Takahashi, H., Takahashi, A., Sakamoto, T., 2006b. In vivo effects of thyroid hormone, corticosteroids and prolactin on cell proliferation and apoptosis in the anterior intestine of the euryhaline mudskipper (*Periophthalmus modestus*). *Life Sciences*, **79** (19): 1873–1880.
- Takashima, F., Strüssman, C. A., 1995. Digestive system. *An Atlas of Fish Histology*, 2nd. ed., edited by Takashima, F. & Hibiya, T. Tokyo-Stuttgart New York: Kodansha-Gustav Fischer Verlag. pp. 89 -115.
- Taylor, J. R., Grosell, M., 2006. Feeding and osmoregulation: dual function of the marine teleost intestine. *Journal of Experimental Biology*, **209** (15): 2939–2951.
- Tugrul, S., Dumlu, G., Baştürk, Ö., İlhal, C., Balkas, T., 1984. *Van Gölü Özümlene Kapasitesinin Saptanması ve Eysel Nitelikli Atıksu Arıtımı ve Deşarji Optimizasyon*. No.0730018301. İller Bank. Gen. Müd. ve TUBİTAK Marmara Arş. Enst. Ortak Projesi, Yayın No: 145, Gebze, 183.
- Turkish Statistical Institute (TÜİK), 2013. *Fishery Statistics*. Ankara: publication number: 4349, ISSN 1013–6177, pp 66.
- Ünal, G., Çetinkaya, O., Kankaya, E., Elp, M., 2001. Histological study of the organogenesis of the digestive system and swim bladder of the *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811 (Cyprinidae). *Turkish Journal of Zoology*, **25**: 217-228.
- Verlecar, X. N., Jena, K. B., Chainy, G. B., 2008. Seasonal variation of oxidative biomarkers in gills and digestive gland of green-lipped mussel *Perna viridis* from Arabian Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **76** (4): 745–752.
- Wilhelm Filho, D., Tribess, T., Gaspari, C., Claudio, F. D., Torres, M. A., Magalhaes, A. R. M., 2001. Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*). *Aquaculture*, **203** (1-2): 149-158.

- Wolf, H. K., Dittrich, K. L., 1992. Detection of proliferating cell nuclear antigen in diagnostic histopathology. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **40**: 1269-1273.
- Wyllie, A. H., 1980. Glucorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**: 555-556.
- Yamamoto, M., Hirano, T., 1978. Morphological changes in the esophageal epithelium of the eel, *Anguilla japonica*, during adaptation to seawater. *Cell and Tissue Research*, **192** (1): 25-38.



ÖZ GEÇMİŞ

Sait CEYLAN, 1991 yılında Antalya’da doğdu. İlköğrenimi Van Atatürk İlköğretim Okulu’nda tamamladı. Lise öğrenimini Van Özel Çağdaş Lisesi’nde tamamladı. 2010 yılında girdiği Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2014 yılında ‘Biyolog’ unvanı ile mezun oldu. 2016 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı.



T. C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 25/10/2018

Tez Başlığı / Konusu:

İnci Kefali (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814)'nin Özafagus ve Bağırsağında Apoptoz ve Hücre Proliferasyonunun Üreme Göçü Sırasında Araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 30 sayfalık kısmına ilişkin, 25/10/2018 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 (yüzde iki)'dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


25/10/2018
Sait CEYLAN

Adı Soyadı: Sait CEYLAN

Öğrenci No: 169102014

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı:

Statüsü: Y. Lisans

Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR



Doç. Dr. Burak KAPTANER
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR



(Unvan, Ad Soyad, İmza)