



**ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) GELİŞİMİ
ÜZERİNE N-BUTANOL'ÜN TERATOJENİK
VE NÖROTOKSİK ETKİLERİ**

Mine KÖKTÜRK

**Doktora Tezi
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı
Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP**

2018

Her Hakkı Saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) GELİŞİMİ ÜZERİNE N-
BUTANOL'ÜN TERATOJENİK VE NÖROTOKSİK ETKİLERİ**

Mine KÖKTÜRK

SU ÜRÜNLERİ MÜHENDİSİLİĞİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2018

Her Hakkı Saklıdır



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



TEZ ONAY FORMU

**ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) GELİŞİMİ ÜZERİNE N-BUTANOL'ÜN
TERATOJENİK VE NÖROTOKSİK ETKİLERİ**

Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP danışmanlığında, Mine KÖKTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma 15/02/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Nazmi POLAT

Üye : Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

Üye : Prof. Dr. Murat ARSLAN

Üye : Prof. Dr. Hasan TÜRKEZ

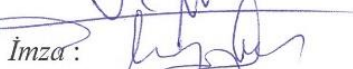
Üye : Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

İmza : 

İmza : 

İmza : 

İmza : 

İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu **22.../02.../2018** tarih ve **8.../...69** nolu kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Cavit KAZAZ
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

ZEBRA BALIĞI (*Danio rerio*) GELİŞİMİ ÜZERİNE N-BUTANOL'ÜN TERATOJENİK VE NÖROTOKSİK ETKİLERİ

Mine KÖKTÜRK

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Su Ürünleri Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

N-Butanol günümüzde kimya sanayinde çok geniş kullanımı alanı olan ve gıda sektöründe, içeceklerde kullanılan bir kimyasaldır. Kullanımının son yıllarda arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada n-butanol'ün farklı konsantrasyonlarının (10, 50, 250, 500, 750, 1000 ve 1250 mg/L) zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarındaki toksik etkileri ve *in vitro* hücre kültüründe etkileri araştırılmıştır. Önce n-butanol'ün zebra balıkları üzerine etkilerine dair herhangi bir çalışmanın mevcut olmaması sebebiyle sınır belirleyici test ile ana testte kullanılacak olan doz aralığı belirlenmiştir. Daha sonra 6 ana test dozu ile 96 saat maruziyet sonucunda LC₅₀ değeri tespit edilmiştir. Probit analizi kullanılarak hesaplanan LC₅₀ değerleri ise n-butanol için 96. saatte 1170,589 mg/L olarak bulunmuştur. Yapılan uygulamada n-butanol'ün teratojenik etkilerinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kardiyak ödem, skolyoz, lordoz, baş gelişim anormalliği, besin kesesi ödemi ve kuyruk anormalliği olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonunda 96. saatte yüksek dozlarda n-butanol uygulamalarında (500, 750 ve 1000 mg/L) beyin dokusunda vakuol oluşumu, karaciğer dokusunda ise vakuol ve nekroz gibi histopatolojik anormallikler gözlenmiştir. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri (Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) ve asetilkolinesteraz enzim aktivitesi doz artışına bağlı olarak azalırken lipid peroksidasyon seviyesinde artış belirlenmiştir. N-Butanol'ün doz artışına bağlı olarak apoptotik hücrelerde ve reaktif oksijen türlerinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca n-butanol'ün konsantrasyonun artışına bağlı olarak zebra balığı embriyolarında 48, 72 ve 96. saatte kalp atış hızı ve kardiyak aktivitenin azaldığı belirlenmiştir. N-Butanol'ün *in vitro* olarak HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) hücre kültürü üzerine etkisinin test edilmesi sonucu endotel dokulara zarar verdiği gözlemlenmiştir. Zebra balığı embriyolarında n-butanol'ün bir diğer önemli etkisi fekal alkol sendromunda görülen alkole bağlı göz boyutunda küçülme (mikroftalmi) ve tek göz oluşumu (siklopi) tespit edilmiştir. Sonuç olarak zebra balığı embriyolarında n-butanol'ün amfifilik yapısıyla kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçerek nörotoksik, teratojenik ve kardiyotoksik etkilere çok yoğun neden olduğu gözlemlenmiştir.

2018, 132 sayfa

Anahtar Kelimeler: N-Butanol, zebra balığı, teratojenite, histopatoloji, apoptozis, asetilkolinesteraz, hücre kültürü

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

TERATOGENIC AND NEUROTOXIC EFFECTS OF N-BUTANOL ON THE DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Mine KÖKTÜRK

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP

N-Butanol is a chemical widely used in the chemical industry and also used in beverages in the food sector. It has been reported to increase its usage in recent years. In this study, teratogenic and toxic effects of different concentrations of n-butanol (10, 50, 250, 500, 750, 1000 and 1250 mg / L) in zebrafish embryos and cell culture were investigated. First, due to the lack of any studies on the effects of n-butanol on zebrafish, the main test were determined with the range-determining test. Then LC₅₀ values were determined as the result of 96 hours of application with 6 main test doses. The LC₅₀ values calculated using the probit analysis were 1170,589 mg / L for n-butanol. Teratogenic effects of n-butanol in the application were found to be cardiac edema, scoliosis, lordosis, head development abnormality, yolk edema and tail abnormality at 24, 48, 72 and 96 hours. At the end of the study, histopathological abnormalities such as vacuole formation in brain tissue and vacuole and necrosis in liver tissue were observed in n-butanol applications (500, 750 and 1000 mg / L) at high doses at 96 hours. The activity of antioxidant enzymes (Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase) and acetylcholinesterase enzyme activity decreased with increasing dose, while the level of lipid peroxidation increased. An increase in apoptotic cells and reactive oxygen species due to n-butanol dose escalation was detected. In addition, heart rate and cardiac activity decreased at 48, 72 and 96 hours in zebrafish embryos, depending on the increase in n-butanol concentration. It has been observed that n-butanol has been shown to damage endothelial tissues in vitro by testing the effect on HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cell culture. Another important effect of n-butanol on zebrafish embryos was the decrease in alcohol-induced eye size (microphthalmia) and single eye formation (cyclopia), which were seen as fetal alcohol syndrome. As a result, it was observed that n-butanol amphiphilic structure in zebrafish embryos easily crossed the blood-brain barrier, causing intense neurotoxic, teratogenic and cardiotoxic effects.

2018, 132 pages

Keywords: N-butanol, zebrafish, teratogenicity, histopathology, apoptosis, acetylcholinesterase, cell culture

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın her aşamasında bilimsel vizyonu ve tecrübesiyle bana yol gösteren, yardım ve ilgilerini esirgemeyen çok kıymetli ve saygıdeğer danışman hocam Sayın Prof. Dr. Muhammed ATAMANALP'e,

Doktora tez değerlendirme komisyonumda olan ve tezimi yazma aşamamda desteklerini gösteren hocalarım Sayın Prof. Dr. Murat ARSLAN ve Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a,

Çalışmam süresince kullandığım model organizma olan zebra balıkları ile ilgili tüm bilgi birikimi ile beni yönlendiren, moleküler ve genetik laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a,

Histopatoloji analizlerimde laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Sayın Doç. Dr. Ahmet TOPAL, Sayın Yrd. Doç. Dr. Selim ÇOMAKLI ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya,

Enzim analizlerimin laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Gonca ALAK'a,

Hücre kültürü analizlerimin laboratuvar aşamasında desteklerini esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Emine TORAMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan anneme ve babama çok teşekkür ederim.

Mine KÖKTÜRK

Şubat, 2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. N-Butanol	10
1.2. N-Butanol'ün Kullanım Alanları.....	10
1.3. N-Butanol Bileşiğinin Üretim Miktarları	11
1.4. N-Butanol Bileşiğine Maruziyet	12
1.5. N-Butanol Bileşiğinin Toksik Etkileri	13
1.6. N-Butanol Bileşiğinin Metabolizması.....	14
1.7. Zebra Balığının (<i>Danio rerio</i>) Genel Özellikleri	17
1.8. Zebra Balığının Hayat Döngüsü ve Gelişimi	18
1.9. Zebra Balığının Model Organizma Olarak Kullanılmasının Avantajları	23
2. KAYNAK ÖZETLERİ	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Balık materyali	40
3.1.2 N-Butanol kimyasalının seçimi ve temini	42
3.2. Yöntemler.....	42
3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması	42
3.2.2. Embriyonik toksisite ve mortalite belirlenmesi.....	44
3.2.3. Larvaların yumurtadan çıkabilme oranının belirlenmesi	44
3.2.4. CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-Diklorodihidrofloresan Diasetat Asetil Ester) indikatörünü kullanarak oksidatif stresin belirlenmesi	44
3.2.5. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi.....	45
3.2.6. Beyin ve Karaciğer histopatolojisi	45

3.2.7. Göz boyutu ölçümü	47
3.2.8. Kalp atış hızı ve kardiyak aktivitenin belirlenmesi	47
3.2.9. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi	48
3.2.10. Antioksidan enzimlerinin aktivitesi ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeyinin belirlenmesi	48
3.2.10.a. Homojenat hazırlanması	48
3.2.10.b. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçülmesi.....	49
3.2.10.c. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçülmesi	50
3.2.10.d. Glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmesi.....	50
3.2.10.e. Lipid peroksidasyonun (MDA) düzeyinin ölçülmesi	51
3.2.10.f. Protein miktarı ölçülmesi	52
3.2.11. HUVEC (İnsan Umbilikal Damar / Vasküler Endotelyum Hücreleri) Hücre kültürü denemesi	53
3.2.11.a. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması	53
3.2.11.b. FBS (Fetal bovine serum) hazırlanması	53
3.2.11.c. PBS Tampon çözeltisinin hazırlanması	53
3.2.11.d. Çalışmada kullanılan hücre soyu.....	53
3.2.11.e. Hücre soyunun başlatılması.....	54
3.2.11.f. Hücrelerin büyütülmesi.....	54
3.2.11.g. Hücrelerin pasajlanması	54
3.2.11.h. Hücrelerin sıvı azotta saklanması.....	55
3.2.11.i. N-Butanol'ün HUVEC hücre kültürüne uygulanması	55
3.2.12. İstatistik analiz.....	56
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1. LC ₅₀ değeri	57
4.2. Yumurta ve Embriyo Mortalitesi	57
4.3. Larvaların Yumurtadan Çıkabilme Başarısı.....	58
4.4. Malformasyon Oranı ve Teratojenik Etkiler	60
4.5. CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-Diklorodihidrofloresan Diasetat Asetil Ester) İndikatörü İle Oksidatif Stres	78
4.6. Apoptozis.....	81
4.7. Beyin ve Karaciğer Histopatolojisi	83

4.8. Göz Boyutu Değişimi	92
4.9. Kalp Atış Hızı, Kalp Aktivitesi ve Morfolojisi	94
4.10. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi	99
4.11. Antioksidan Enzimlerin (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatiyon Peroksidaz) Aktivitesi ve Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi	98
4.12. HUVEC (İnsan Umbilikal Damar / Vasküler Endotelyum Hücreleri) Hücre Kültürü	100
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	102
KAYNAKLAR	111
EKLER.....	132
EK 1.....	132
ÖZGEÇMİŞ	133

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AO	Akridin Oranj (boyama yöntemi)
AChE	Asetilkolinesteraz
MDA	Malondialdehit
CAT	Katalaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
ALS	Amiyotrofik lateral skleroz (motor nöron hastalığı)
ALD	Alkolik karaciğer hastalıkları
AIS	Ergenlik idiyopatik skolyoz
ADH	Alkol dehidrojenaz
ACAT	Asetil-koenzim A asetiltransferaz
CS	Konjenital (doğuştan) skolyoz
CO ₂	Karbondiyoksit
Ca	Kalsiyum
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
CM-H2DCFDA	5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester
DCF-DA	2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
ddH ₂ O	Steril ultra saf su
PSA	Penisilin, streptomisin, amfoterisin
EDTA	Etilen diamin tetra asitik asit
EU	Avrupa Birliği
FAS	Fetal alkol sendromu
FBS	Fetal Bovine Serum
IS	İdiyopatik skolyoz
gr/ml	Bir mililitredeki gram
HCO ₃	Bikarbonat
HE	Hematoksilen–Eozin Boyama
HPB	4- (4-hidroksifenil) -2-butanol

HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
KCl	Potasyum klorür
LD ₁₀₀	Canlının %100'nü Öldüren Doz
LD ₅₀	Canlının %50'sini Öldüren Doz
mg/kg/gün	Günde vücut ağırlığının her kilosu için verilecek miligram
mg/L	Bir litredeki miligram
mM	Milimolar
MT	Metalotiyonein
nL	Nanolitre
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PAE	Prenatal (doğum öncesi) alkol maruziyeti
pH	H iyonu derişiminin 10 tabanında (-) logaritması
PBS	Phosphate buffered saline
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Toplam madde miktarının milyonda birlik kısmı
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
Rpm	Dakika içerisinde gerçekleştirilen devir sayısı
KSS	Kearns-Sayre sendromu
Bpm	Dakikadaki kalp atım sayısı
Pound (lb)	Ağırlık ölçüsü birimi (0,45359237 kg)
NIOSH	Ulusal İş Sağlığı Güvenliği Enstitüsü
EPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı
g/cm ³	Bir santimetreküpteki gram

g/L	Litredeki gram
BA	Butil alkol
CNS	Merkezi sinir sistemi
ABE	Aseton Butanol-Etanol



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. N-Butanol üretiminin kimyasal yolu	15
Şekil 1.2. Klostridial fermentasyonun metabolik yolu.	16
Şekil 1.3. Zebra balığı embriyosu gelişim döngüsü	19
Şekil 1.4. Zebra balığı larvasının 96. saatteki anatomik yapısı	20
Şekil 3.1. Zebra balığı kapalı devre sistemi	41
Şekil 3.2. Deneme ünitesi	44
Şekil 3.3. HUVEC (İnsan umbilikal damar / vasküler endotelyum hücreleri) hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.	54
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda n-butanol bileşiğine 120 saat süreyle maruz kalmış zebra balığı embriyo ve larvalarındaki ölüm oranı	58
Şekil 4.2. N-butanol uygulanmış döllenmiş zebra balığı embriyolarının koryondan çıkabilme oranı	59
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda n-butanol bileşiğine 96 saat süreyle maruz kalmış zebra balığı embriyo ve larvalarındaki malformasyonların oranı.....	61
Şekil 4.4. Kontrol grubu 24.saatteki zebra balığı embriyosu.....	64
Şekil 4.5. Zebra balığı embriyolarına 10 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri	64
Şekil 4.6. Zebra balığı embriyolarına 50 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri	64
Şekil 4.7. Zebra balığı embriyolarına 250 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri.....	65
Şekil 4.8. Zebra balığı embriyolarına 500 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri.....	66
Şekil 4.9. Zebra balığı embriyolarına 750mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri	66
Şekil 4.10. Zebra balığı embriyolarına 1000mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri.....	67
Şekil 4.11. Kontrol grubu 48. saatteki zebra balığı larvası.....	67
Şekil 4.12. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	68
Şekil 4.13. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	68
Şekil 4.14. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	69
Şekil 4.15. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	69
Şekil 4.16. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	70
Şekil 4.17. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri.....	70
Şekil 4.18. Kontrol grubu 72. saatteki zebra balığı larvası.....	71

Şekil 4.19. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	71
Şekil 4.20. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	72
Şekil 4.21. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	72
Şekil 4.22. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	73
Şekil 4.23. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	73
Şekil 4.24. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri.....	74
Şekil 4.25. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvası.....	74
Şekil 4.26. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	75
Şekil 4.27. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	75
Şekil 4.28. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	76
Şekil 4.29. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	76
Şekil 4.30. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	77
Şekil 4.31. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri.....	77
Şekil 4.32. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile floresan oluşumu ile reaktif oksijen türlerinin görünümü	78
Şekil 4.33. a) 250 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde (ok) reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışımaya, b) 50 mg/L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki görünümü.....	79
Şekil 4.34. 500 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışımaya (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışımaya	79
Şekil 4.35. 750 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen	

türlerindeki artışa bağlı ışıma (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışıma	80
Şekil 4.36. 1000mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'- diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışıma (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışıma	80
Şekil 4.37. N-butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarında etkisine bağlı tüm vücuttaki apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi..	81
Şekil 4.38. N-butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarında beyin bölgesinde etkileri sonucu apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi	82
Şekil 4.39. N-butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarında etkisine bağlı derideki apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi ...	82
Şekil 4.40. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larva beyin dokusu normal histolojik görünümü	84
Şekil 4.41. 10 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	84
Şekil 4.42. 50 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	85
Şekil 4.43. 250 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	85
Şekil 4.44. 500 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	86
Şekil 4.45. 750 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	86
Şekil 4.46. 1000 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü.....	87
Şekil 4.47. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvası karaciğer dokusu normal histolojik görünümü	89

Şekil 4.48. 10 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	89
Şekil 4.49. 50 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	90
Şekil 4.50. 250 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	90
Şekil 4.51. 500 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	91
Şekil 4.52. 750 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	91
Şekil 4.53. 1000 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü.....	92
Şekil 4.54. N-butanol'ün zebra balığı embriyo ve larvalarının göz gelişimi üzerine etkileri.....	93
Şekil 4.55. N-butanol'ün farklı dozlarına bağlı olarak zebra balığı embriyo ve larvalarının göz boyutlarındaki değişimler	93
Şekil 4.56. N-butanol'ün farklı dozlarına bağlı olarak zebra balığı larvalarının kalp atım sayısındaki değişimler	95
Şekil 4.57. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki kontrol grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	95
Şekil 4.58. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 10 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	96
Şekil 4.59. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 250 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	96
Şekil 4.60. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 500 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	97
Şekil 4.61. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 750 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	97

Şekil 4.62. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 1000 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).....	98
Şekil 4.63. Fertilizasyondan sonra 96. saatteki zebra balığı larvalarında n-butanol'ün kalp morfolojisi üzerine etkileri.....	98
Şekil 4.64. Zebra balığı embriyolarında 96. saatte n-butanol'ün farklı konsantrasyonlarının asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi üzerine etkisi	99
Şekil 4.65. N-butanol'ün farklı dozlarının (0, 250, 500, 750 ve 1000mg/L) HUVEC hücre kültürü üzerine 60 dakika ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksik etkisinin morfolojisinin mikroskop görüntüsü	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. N-Butanol (1-butanol, butil alkol, metilol propan) fiziksel ve kimyasal özellikleri	42
Çizelge 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında farklı dozlardaki n-butanol'ün oluşturduğu malformasyon oranları	60
Çizelge 4.2. Farklı dozlardaki n-butanol'ün beyin dokusundaki vakuolizasyon oluşumu.....	83
Çizelge 4.3. Farklı dozlardaki n-butanol'ün karaciğer dokusundaki vakuol oluşumlarının değerlendirilmesi	88
Çizelge 4.4. Farklı dozlardaki n-butanol'ün karaciğer dokusundaki nekrotik değişimlerin değerlendirilmesi	88
Çizelge 4.5. N-butanol'ün fertilizasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki zebra balığı embriyo ve larvalarının göz gelişimi üzerine etkileri	94
Çizelge 4.6. Zebra balığı larvalarında 96. saatte n-butanol'ün farklı konsantrasyonlarının antioksidan enzim aktivitesi ve MDA düzeyi üzerine etkileri.	100

1. GİRİŞ

Teratolojik denemeler anneden embriyoya ksenobiyotik maddelerin etkisinin gözlemlenebildiği tavşan ve kemirgenler gibi memeli hayvan modellerinde yürütülmektedir. Ancak bu çalışmalar genel olarak pahalı, fazla zaman alan ve çok sayıda denek gerektiren araştırmalardır. Ayrıca bu hayvan modellerindeki denemeler hayvan refahı, koruma ve etik gibi konularda kaygıları arttırmaktadır. Günümüzde bu kaygılar Avrupa Birliği direktifi 2010/63/EU'ne göre zebra balıklarının (*Danio rerio*) hayat evrelerinin kullanılmasıyla yapılan denemeler ile ortadan kalkmıştır (Mahler and Butcher 2011).

Zebra balıkları diğer canlılar ile anatomik, hücresel, fizyolojik ve genetik süreçlerinin yüksek derecede benzerlik göstermesinden dolayı farklı araştırma alanlarında özellikle de embriyonik gelişim sürecinde toksik ajanların etkilerinin izlenmesinde daha fazla tercih edilen model organizma olmuştur (Sipes *et al.* 2011; Truong *et al.* 2011; Strahle *et al.* 2012; Binder and Zon 2013). Zebra balıklarının embriyonik süreçleri, kardiyovasküler, somit, kas, iskelet ve nöral sistemleri içine alan birçok yönleri ile memeli hayvanlara benzerlik göstermektedir (McCollum *et al.* 2011). Zebra balığı emriyoları şeffaf vücut yapısı ile kimyasal maddelerin derideki pigment hücrelerine etkilerinin incelenmesi için uygun bir model organizmadır.

Alkol tüketimi, dünya çapında en ciddi madde kullanım bozukluklarından biridir. Alkolle ilişkili ölümler, hastalıklar ve engellilik durumu erkeklerde (%8-18) kadınlara (%2-%4) göre daha yüksektir ve bu oranın gelişmiş ülkelerde daha da yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ulusal Alkol İstismarı ve Alkolizm Enstitüsü'ne göre, her yıl yaklaşık 80.000 kişi alkolle ilgili nedenlerden ötürü ölmekte ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ölüm sebeplerinde üçüncü sırayı aşırı alkol kullanımı almaktadır. Yaklaşık 14 milyon Amerikalı (%7,4) alkol bağımlılığı veya alkol istismarı olarak sınıflandırılan bir alkol kullanım bozukluğuna sahiptir (Grant *et al.* 2004). Alkol bağımlılığında kalıtsallık durumunun %50-%60 oranı arasında değiştiği tahmin edilmektedir (Dick and Bierut 2006; Ducci and Goldman 2008). Bununla birlikte

alkolizm, karmaşık gen-gen ve gen-çevre etkileşimleri ile oluşan çok faktörlü ve poligenik bir hastalıktır (Corbin *et al.* 2013). Aşırı alkol tüketimi, kardiyovasküler ve karaciğer hastalıkları, metabolik bozukluklar, beslenme yetersizliği, kanser (ağız, mide, kolon, karaciğer ve meme kanseri gibi), nörobiyolojik bozukluklar ve fetal anormallikler riskini artırır (Good 1996).

Alkol, etkilerinin sıklığı ve toplum üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı şüphesiz en zararlı kimyasallardan biridir. Son yıllarda yaygın olarak endüstri ve gıda sektöründe kullanımı artan bir alkol türü olan butanollerin etkileri ile ilgili yeterli çalışma olmadığına dikkat çekilmiştir (Bale and Lee 2016).

Butanoller, n-butanol, tert-butanol, sec-butanol ve isobutanol olmak üzere dört izomeri olan dört karbon ve bir karboksil gruptan oluşan alkollerdir. Butanoller yaygın olarak boyalar için çözücü (baskı mürakkepleri), petrokimyada, ilaçlar, antibiyotikler, hormonlar ve vitaminlerin üretiminde, cila ve temizleyicilerde katkı maddesi, tekstil endüstrisinde çözücü (plastik boyama), sentezler için hammadde, içecekler ve tatlandırıcılarda katkı maddesi (karbonhidrat fermantasyonu için) olarak kullanılmaktadır (ECETOC 2003a). Canlılar butanollere içme suyu, yiyecekler ve hava aracılığı ile maruz kalmaktadır. Toksikolojik çalışmalarda karaciğer, böbrek, beyin ve gelişim biyolojisi üzerine etkileri rapor edilmiştir (OECD 2004; McGregor 2010). Butanollerin laboratuvar hayvanları üzerine nörotoksik etkileri ve gelişimsel toksisitesi gözlemlenmiş olup sucul organizmalarda etkileri hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır. Birçok alkol grubunun teratojenik etkilerinin tespit edilmesine karşın butanollere ait herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Butanol mekanizması için önemli olan nöral L1 hücresel bağlama molekülleri, akson büyümesinde öncü olan ve sinir sistemi gelişiminde kritik öneme sahip bir membran proteindir. Butanollerin gelişimsel nörotoksikite etkilerinin neden olduğu mekanizma hipotezine göre bu L1 proteinleri butanoller ile etkileşimi ve bağlanması ile astrositlerin (sinir hücresi) bölünmesinin bozulmasına, akson büyümesinin engellenmesine, fosfolipaz D fonksiyonunun değişmesine bağlı olarak nörotransmitter ve hormonların değişimine neden olduğu belirtilmiştir (Bale and Lee 2016).

Butanol toksisitesi, bu kimyasalın hidrofilik özelliğinden dolayı hücre zarı akışkanlığını arttırması ile meydana gelmektedir (García *et al.* 2011). Bunun sonucu olarak, hücre içi ve hücre dışı arasında bir kontrol bariyeri olarak hücre zarı fonksiyonu etkilenir (Ezeji *et al.* 2007; Napoli *et al.* 2010).

N- Butanol ilk olarak alkol dehidrojenaz enzimi (az miktarda sitokrom P450 enzim aktivitesi) tarafından butirik aldehite daha sonra aldehit dehidrojenaz enzimi ile n-butirik asite metabolize edilir (ECETOC 2003a). N-Butirik asit oksidasyon reaksiyonu ile CO₂ üretir. Alkol dehidrojenaz (ADH) yüksek organizmalarda var olan, büyük ölçüde alkol ve aldehitlerin metabolizmasına katılan önemli bir detoksifikasyon mekanizmasıdır. Alkol dehidrojenaz, NADH üretimi, uygun bir karbonil bileşiği ve bir kofaktör olarak NAD⁺ kullanarak alkol oksidasyonunun ilk adımını katalizler (Jörnvall *et al.* 1995).

Zebra balıkları alkol teratojenitesi mekanizmasının araştırılması için etkili bir model sistemdir. Çünkü zebra balığı embriyolarının üzerine alkolün etkileri insanlarda görülen nörokraniyal, kraniyofasiyal iskelet gelişimi değişimleri ve ikincil organlardaki büyüme yavaşlaması gibi etkiler ile benzerdir (Carvan *et al.* 2004). Ayrıca zebra balıklarında embriyo dışarıda geliştiğinden fetüs üzerine anneden kaynaklanan etkiler ortadan kaldırılmış olur. Bu anne ile ilgili etkiler alkolün tetiklediği gelişim anormallikleri için fetüsün hassasiyeti ve mekanizmasının keşfedilmesi için yanıltıcı faktörlerdir (Arenzana *et al.* 2006).

Embriyogenez, toksik madde maruziyetine karşı yüksek hassasiyete sahiptir. Bu nedenle bu biyolojik aşama toksik maddelerin test edilmesinde önemlidir. Toksik maddeler embriyonik dönemde test edilerek güvenli sınırları kolaylıkla belirlenebilir. Ancak çoğu kimyasal günümüzde, güvenli veri eksikliği ile ticari olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Oxendine *et al.* 2006). Zebra balıkları embriyogenez evresindeki toksik ajanlara karşı hassasiyetlerini ölüm oranı ve hızlı gelişen malformasyonlar ile gösterdiğinden birçok toksik maddenin test edilmesinde kullanılabilecek en özel model organizmadır.

Alkolün beyin gelişimi üzerine etkileri karmaşıktır. Bazı beyin hücreleri için alkol, hücre ölümüne neden olabilirken, beyindeki diğer bir grup hücre için ise hücresel işlevleri engelleyebilir. Alkol, hücrelerin gelişim safhasına bağlı olarak belirli bir hücre popülasyonunda farklı mekanizmalar yoluyla hücrelerin sayısını azaltabilir (West *et al.* 1994; Guerri 2002). Örneğin, fetusun beynindeki sinir hücreleri (nöronlar) hücre bölünmesi ile çoğalır ve gelişme sırasında tam yapısının oluşacağı ve işlevlerini yerine getireceği uygun bölgeye göç eder. Ancak bu hücrelerin bazı grupları hücre bölünmesi sırasında alkole maruz kalırsa, yeni hücre oluşumu hücre bölünme oranının değiştirilmesi ile azalabilir. Gelişimin bir sonraki aşamasında da alkol maruziyeti devam ederse, hücreler artık bölünmediğinde, alkol kaynaklı hücre ölümünün sonucu olarak nöron popülasyonu azalabilir. Beyin hücreleri geliştikçe, alkol etkilerine duyarlılıkları değişebilir. Alkole karşı değişen bu duyarlılık, motor koordinasyon ve motor öğrenmeyle ilgili bölge olan beyincikte (serebellum) bulunan Purkinje hücreleri adı verilen nöronal bir hücre tipinde gösterilebilir. Hücre bölünmesi sırasında, alkol maruziyeti, yeni Purkinje hücreleri üzerinde en az etkiye sahip gibi görünmektedir. Bununla birlikte, gelişimin daha sonraki aşamasında Purkinje hücreleri özellikle hücre ölümüne karşı savunmasız kalabilir (Goodlett and Horn 2001).

Beyin de dahil olmak üzere gelişmekte olan organizma üzerinde alkolün birçok etkisi, hücre ölümü ile sonuçlanır. Nekroz ve apoptoz olarak adlandırılan iki genel hücre ölüm süreci vardır. Bu iki süreç, hücre ölümü sırasında farklı morfolojik ve biyokimyasal değişim modelleri vasıtasıyla ayırt edilebilir. Nekroz, nöronların bir travma veya metabolik yaralanma ile hasar gördüğünde ve genellikle hücre gruplarının eşzamanlı ölümünün gerektirdiğinde oluşur. Nekroz geçiren hücreler başlangıçta şişerler ve iç bileşenleri veya organelleri bozulur. Hücreler sonunda parçalanır ve bölgesel enflamasyona (iltihaplanma) yol açan yığınlar oluşur. Bu iltihaplanma, bitişik hücrelerin ölümüne neden olabilir (Goodlett and Horn 2001). Tersine, apoptoz, tek hücreleri etkileyen "hücre intiharının" bir şeklidir. Apoptoz, Alzheimer hastalığı ve amiyotrofik lateral skleroz (motor nöron hastalığı = ALS veya Lou Gehrig hastalığı) dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi (MS) bozukluklarının geniş bir kısmında yer almasına rağmen, apoptozun organizma için her zaman kötü olmadığına dikkat etmek önemlidir.

Apoptotik hücre ölümü, gelişim sırasındaki normal merkezi sinir sistemi oluşumu için de kritik öneme sahiptir. Apoptoz sırasında hücre hacmi küçülür ve çekirdeğin içindeki DNA küçük parçalara ayrılmadan önce yoğunlaşır. Bu sırada hücrenin organelleri bozulmadan kalır. Ancak sonunda, hücre hala bir zar ile çevrelenen birkaç küçük parçaya ayrılır. Bu "küçük apoptotik parçacıklar" daha sonra temizleyici hücreler tarafından yok edilir. Apoptoz, başlatıldıktan sonra hızla ilerleyebilir, ancak toksik bir etki sonrasında bir süre ertelenebilir (Bredensen 1996a, b). Beyine yeterli kan tedarik edilememesi, hücrede enerji üretiminden görevli olan mitokondride bozulmalar, hücredeki normal kalsiyum seviyesinin bozulması ve oksidatif stres gibi birçok faktör merkezi sinir sistemindeki hücrelerin apoptozunu indükleyebilir. Bu faktörlerden bazıları hem apoptozu hem de nekrozu indükleyebilir. Ayrıca alkol de apoptozu indükleyebilen bir bileşiktir. Bazı hayvan modelleri embriyonik dönemde alkole maruz kaldığında baş nöral krestinde ve hipotalamustan kültüre alınan hücrelerde alkol etkisi ile apoptoz oluşumu belirlenmiştir (De *et al.* 1994; Cartwright *et al.* 1998).

Oksidatif stres, apoptozu ve nekrozu indükleyebilen önemli bir faktördür. Oksidatif stres hücrelerde aşırı miktarda serbest radikal bulunma sonucunda oluşur. Serbest radikaller, hücredeki çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar sırasında oluşabilecek oldukça reaktif moleküllerdir. Bu serbest radikallerin birçoğu oksijen içerir ve bunlara reaktif oksijen türleri (ROS) denir. Genellikle ROS ve diğer serbest radikallerin seviyeleri, hücrede belirli bir seviyede bulunur ve serbest radikalleri yok eden antioksidanlar olarak bilinen çeşitli moleküller tarafından kontrol edilirler. Hücre içindeki normal antioksidan seviyeleri, alkol gibi toksik bir madde nedeniyle azalırsa, oksidatif stres oluşabilir (Bredensen 1996a, b). Alkole bağlı aşırı ROS seviyelerinin oluşumu da hücrelere zarar verebilir ve mitokondri işlevine müdahale ederek hücre ölümünü indükler. Mitokondri, özellikle nöronlar için önemli olan kalsiyumu depolayan ve hücredeki kalsiyum seviyelerini düzenleyici olarak önemli fonksiyona sahiptir. Nöronların etrafındaki kalsiyum kanallarındaki akış nöronlar arasındaki kimyasal ileti için önemlidir. Doğru nöronal fonksiyon sağlamak için, nöron içerisindeki kalsiyum seviyeleri uygun bir şekilde düzenlenmelidir. Dahası, aşırı iç kalsiyum konsantrasyonları nöronlar için toksik

olabilir. Bu nedenle, mitokondrinin kalsiyum seviyesini düzenleme fonksiyonu, nöronların fonksiyonları ve hayatta kalmaları için hayati öneme sahiptir (Choi 1996).

Alkol (etanol) katabolizması esnasında birçok enzim aktivitesi (katalaz, alkol dehidrojenaz ve sitokrom P450) gerçekleşmektedir ve bu süreç doğal olarak, reaktif oksijen türlerini (ROS) (örneğin süperoksit serbest radikalleri, hidrojen peroksit ve hidroksil kökleri) üretir (Hipolito *et al.* 2007; Haorah *et al.* 2008). Ancak aşırı ROS üretimi, DNA, lipit ve protein metabolizmasını bozan merkezi sinir sistemi redoks dengesini değiştirebilir (Comporti *et al.* 2010). Bazı hayvan modellerinde kronik alkol denemeleri sonucunda süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutatyon redüktaz (GR) aktivitelerinde önemli oranda azalmaların olduğu belirlenmiştir (Zimatkin and Buben 2007; Hernández *et al.* 2016; Müller *et al.* 2017).

Asetilkolinesteraz, kolinerjik iletimin asetilkolin (ACh)'nin kolin ve asetata indirgenmesi ile sonlandırılmasından sorumlu enzimdir (Rosemberg *et al.* 2010). Asetilkolinesterazın inaktivasyonu asetilkolin birikimine, nikotinik ve muskarinik reseptörlerin aşırı uyarılmasına ve nörotransmisyonun bozulmasına neden olur. Aynı zamanda, AChE enzimidaki değişimlerin apoptoz, hücre-hücre etkileşiminin düzenlenmesinde, hücre çoğalması ve farklılaşmasında da önemli rolü olduğuna dair artan kanıtlar vardır (Lazarevic-Pasti *et al.* 2017). Yapılan bazı çalışmalarda, akut alkol uygulamalarında asetilkolinesteraz enzim aktivitesinde artış belirlenirken kronik alkol uygulamalarında ise asetilkolinesterazın azaldığını tespit etmişlerdir (Hardy *et al.* 1985; Arendt *et al.* 1988; Arendt *et al.* 1989; Rico *et al.* 2006; Rico *et al.* 2007; Rosemberg *et al.* 2010; Phunchago *et al.* 2015; Sun *et al.* 2017).

Teratojen olarak alkol etkisine bakıldığında beyinin normalden küçük olabildiği, nöronal ve glial göç bozuklukları gösterdiği tespit edilmiştir (Streissguth and Martin 1983). Alkol etkisi ile frontonazal yapıda (ön beyin hemen altındaki yapı) ve kraniyal sinir ganglionunda belirgin hücre kaybı belirlenmiştir (Sulik *et al.* 1988). Alkolün etkisi ile hücre ölümünün nedeni, hücre membranlarına zarar veren süperoksit radikallerinin artışının olduğu bilinmektedir (Kotch *et al.* 1995; Sulik 2005). Bir diğer görüş ise;

yoğun hücre ölümünün altında anormal sinyal iletiminin yatıyor olabileceğidir. Alkole maruz kalan embriyolarda Sonic hedgehog genin ekspresyonu azalmıştır. Bu gen ifadesinin azalması mekanizması tam olarak anlaşılmamışsa da baş mezenşiminde bulunan SHH (sonic hedgehog) salgılayan hücrelerin kranial nöral krest hücrelerinin ölümünü engelleyebildiği bulgusu, alkolün teratogenezinde SHH yolağındaki bozukluğun önemini vurgulamaktadır (Ahlgren *et al.* 2002; Chrisman *et al.* 2004; Kashyap *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2013). Ayrıca SHH'nin organogeneze önemli roller oynadığı da bilinmektedir (Ingham and McMahon 2001; Charrier *et al.* 2001; Kiecker 2016; Weiss *et al.* 2017). SHH geninin ekspresyonu ve fonksiyonları ile ilgili çalışmalarda bazı model türlerde (fare, tavuk, zebra balığı) bu genin çeşitli organların (nöral tüp, somitler, deri uzantılar, yüzgeç ışınları, dişler, yüzgeç ve kanat tomurcukları) gelişimi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Laufer *et al.* 1994; Fan *et al.* 1995; Bitgood and McMahon 1995; Iseki *et al.* 1996; Varjosalo and Taipale 2008).

Alkol teratogenezi ile ilgili başka bir mekanizma, alkol teratogenezinin, hücre adezyon molekülü olan L1 molekülünün hücreleri bir arada tutma yeteneğini engellemesi olabilir. Ramanathan *et al.* (1996) etanolün kan ve beyinde 7 mM konsantrasyonu L1 proteinin bağlayıcı fonksiyonunu durdurduğunu *in vitro* olarak göstermişlerdir.

Etanol'ün fetusun gelişimi için toksik olduğu bilinmektedir. Alkole maruz bırakılan zebra balığı embriyoların da eksensel bozukluklar, gelişimde gerileme, epiboli ve gastrulasyon evrelerinde kusurlar, notokord ve omurilik anormallikleri ve küçük göz oluşumu tespit edilmiştir (Arenzana *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010).

Fetal alkol sendromu (FAS) gelişim boyunca alkole maruz kalan yeni doğarlarda (0,5-3/1000 yeni doğan) görülen malformasyonlar ve doğuştan olan fonksiyon anormallikleridir. FAS, doğum öncesi ve doğum sonrası embriyodaki büyüme yetersizliği, merkezi sinir sistemindeki bozukluklar, bazı kardiyovasküler sorunlar, yüz ve organlarda kusurlu oluşumlar olarak tanımlanan bir rahatsızlıktır (Sulik 2005; Cudd 2005). Göz alanının ayrılma bozukluğu olan siklopi, fetal alkol sendromu ile olan yeni

doğanlarda gözlemlenen çok ciddi doğuşsal bir anormalitedir (Streissguth 1997; Arenzana *et al.* 2006; Olejek *et al.* 2011).

Genetik faktörlere bağlı olmayan etkenler kalp morfogenezi, farklılaşan hücre fonksiyonu ile değiştirmektedir. İki önemli genetik olmayan faktör kardiyotoksik ajanlar ve hemodinamik zorlanmadır. Kalp, kalp atışı ile eşzamanlı olarak gelişir. Biyomekanik zorlamalar, kardiyak morfogenezi etkileyen kalp atışı tarafından oluşturulur. Tavuk ve zebra balığı modellerinde yapılan çalışmalar, normal kan akışının bozulmasının önemli kardiyak anormalliklere neden olduğunu göstermiştir (Hove *et al.* 2003; Granados-Riveron and Brook 2012; Lindsey *et al.* 2014). Epikardiyum ve epikardiyumdan oluşan progenitor hücrelerinin kalp yenilenmesi, kalp damar düzeninin gelişimi, kardiyak morfogenez, fibroblastların üretilmesi, kalp kasılması, valf gelişimi ve kardiyomiyosit çoğalmasında kritik role sahip olduğu düşünülmektedir (Lepilina *et al.* 2006; Olivey and Svensson 2010). Çalışmalar alkolün kalp büyüklüğünü değiştirdiği, ventrikular duvarın kalınlığını azalttığını ve daha düşük kalp atış frekansına neden olduğunu göstermiştir (Dlugos and Rabin 2010).

Yüksek alkol maruziyeti kan damarlarında ciddi zararlara bağlı olarak ödeme neden olur. Ödem, deri altında ve vücut boşluklarında yerleşmiş olan farklı iki doku tabakası arasında kalan ayırıcı bölgelerinde vücut sıvısının anormal birikmesidir. Patolojik olarak, endotel geçirgenliğindeki kusurlar ödeme neden olabilir ve doku sıvı basıncını arttırabilir. Ayrıca kalp fonksiyonlarındaki eksikliklerde ödeme neden olduğu bildirilmiştir (Dejana *et al.* 2009). Alkole maruz bırakılmış zebra balığı larvalarındaki kan damarlarının farklı alkol konsantrasyonları altında farklı derecelerde hasar gördüğü tespit edilmiştir. Yüksek dozlardaki alkol maruziyetinde dorsal aort çok daha fazla hasar görmüştür. Kan miktarındaki azalma ve geçirgenliğinin değişimine bağlı olarak ödemlerin oluşabileceği bildirilmiştir. Ayrıca alkole maruz kalındığında daha küçük baş ve gözler, daha kısa boy, kalp morfolojisinde ve fonksiyonlarında hasarlar tespit edilmiştir (Li *et al.* 2016).

Omurgalılarda, retinal epitel pigment hücreleri hariç kromatoforlar çoğunlukla nöral krest hücrelerinden (nöroektodermal hücreler) gelişirler (Le Douarin and Kalcheim 1999). Nöral krest hücreleri gastrulasyon sırasında somitogenez aşaması boyunca anteriordan posteriora doğru göç ederek nöroepitelyadan uzaklaşır. Daha sonra, nöral krest hücreleri bazı sinyalizasyon ve transkripsiyonel faktörler tarafından düzenlenmiş aşamalar altında nöronlar, duyu gliaları, kromatoforlar, kemik ve kıkırdak da dahil olmak üzere farklı hücelere farklılaşırlar. Çevresel kirleticilerin gen düzenleyici ağlarında kromatogenezi ve pigmentasyonu nasıl etkilediğini tartışan çalışmalar azdır (Xu *et al.* 2017). Melanogenez melanomaformasyon, melanoblastların farklılaşması ve migrasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesi ve melanositlerin hayatta kalması gibi indüktif bir ilerlemedir (Levy *et al.* 2006). Yapılan bazı çalışmalar butanol'ün melanin sentezini inhibe ettiği ve tekrarlanan yüksek konsantrasyonlarında tirozinaz enziminin inhibe olması sonucu insan melanositlerine karşı sitotoksikite göstererek depigmentatif bozukluklar oluşturduğunu göstermiştir (Kuroda *et al.* 2014; Sasaki *et al.* 2014; Kim *et al.* 2016).

Alkole maruz bırakılan bazı model organizmalarda, insanlarda alkol tüketimi sonucu karaciğerde oluşan histopatolojik değişimler (yağlanma, inflamasyon, nekroz ve fibrozis) gözlemlenmiştir. Alkoller öncelikle merkezi sinir sistemine zarar veren kimyasal maddeler olduğundan teratojenite incelemelerinde patolojik bulgular ile diğer analizlerin desteklenmesi gerekmektedir. Karaciğerde patolojik hasar geri dönüşümlüdür. Çünkü karaciğer hücreleri kendini yenileyebilir. Ancak merkezi sinir sisteminde meydana gelen bir hasar geri dönüşümsüzdür ve teratojenik etkiler çoğunlukla geri dönüşümsüz toksik etki olarak kabul edilir. Ayrıca merkezi ve periferik sinir sistemleri en sık sistemik toksisite gözlenen hedef organdır (Tsukamoto *et al.* 1986).

1.1. N-Butanol

Butanoller dört karbon ve bir hidroksil grubundan oluşan alkollerdir. Butil alkol (BA), kaynama noktası 117,6°C ve erime noktası -89,9°C olan sıvı karakterinde bir kimyasaldır (Union Carbide Corporation 1992). Bu kimyasalın yoğunluğu sudan daha az olup 20°C'de 0,8098 g/cm³'tür (Weast and Astle 1985). Suda çözünme limiti yaklaşık olarak 20°C'de 77 g/L olup bu değer n-butanol'ün suda çok iyi çözündüğünü göstermektedir (Merck 1983). Butanollerin dört izomerinden biri olan n-butanol'ün bazı sinir gelişimsel değişimlere sebep olduğu tespit edilmiştir (Nelson *et al.* 1989a; McLaughlin *et al.* 1964; Sitarek *et al.* 1994; Ema *et al.* 2005).

Butanol, mikroorganizmalarda ilk olarak 1861 yılında, Louis Pasteur tarafından keşfedilmiştir (Jones and Woods 1986). 1911 yılında Fernbach tarafından, patatesten butanol üreten bir bakteri kültürü olduğu belirlenmiş ve 1912 yılında, Fernbach'in asistanı Weizmann tarafından bu bakterinin *Clostridium acetobutylicum* olduğu saptanmıştır (Jones and Woods 1986). 1945 yılında, Birleşik Devletler için Aseton Butanol-Etanol (ABE) fermentasyonu ile butanol üretimi, endüstrinin büyük bir bölümünü oluştururken, 1960'larda hammadde fiyatlarındaki artış nedeniyle butanole olan ilgi azalmıştır. Sadece, Rusya ve Güney Afrika'da, substrat ve iş gücü maliyetleri düşük olduğu için ABE fermentasyonu çalışmalarına 1990'ların başına kadar devam edilmiştir. 2006 yılında, Rusya ve Çin'de yeniden ABE fermentasyonu ile üretim yapmaya başlayan şirketlerin kurulması ile tarımsal atıkları kullanarak n-butanol üretimi yeniden hız kazanmıştır (Zverlov *et al.* 2006; Ni and Sun 2009; Niemistö 2013).

1.2. N-Butanol'ün Kullanım Alanları

Butil alkol ağırlıklı olarak bir sanayi ara maddesi olarak kullanılır. Örneğin bütül asetat ve diğer bütül esterlerini yapmak için kullanılır. Ayrıca dibutil ftalat, farmasötik maddeler, polimerler, piroksilin plastikler, bütül ksantat ve diğer butil bileşiklerinin üretiminde kullanılır. Butil alkol üre/formaldehit ve melamin/formaldehit reçinelerinin imalatında seyreltici reaktif olarak kullanılır. Endüstriyel bir ara madde olarak

kullanıldığında, butil alkol, kimyasal dönüştürme yoluyla istenilen üründen türetilir. Butil alkol daha az ölçüde çözücü olarak, boyalar, reçineler ve cilaları yapmak için kullanılır. Bazı tırnak cilası formülasyonlarının bir bileşenidir. Kauçuk, çimento, güvenlik camı, suni ipek, su geçirmez kumaş, yapay deri, yağmurluk, hareketli resim ve fotoğraf filmi yapımında kullanılır (Tabershaw *et al.* 1944; Sterner *et al.* 1949; Doolittle 1954). Parfümlerde, meyve özlerinde, yiyecek ve içeceklerde tatlandırıcı olarak da kullanılır (Hall and Oser 1965).

Ayrıca butanol motorlarda kullanım için çok uygun bir biyoyakıttır. Etanolde olduğu gibi butanol de biyokütle hammaddesinin alkol fermantasyonu ile üretilen, biyokütle bazlı yenilenebilir bir yakıttır (Ezeji *et al.* 2005; Togbé *et al.* 2010). Etanol gibi butanol de yakıt ile çok iyi karışabilir. Ayrıca, butanol dizel ile karışım yapılmak için gelecekte bir seçenek olabilir. Butanol biyodizel ile karşılaştırıldığında daha fazla oksijen içeriği barındırması ile daha az duman salınımına da sahiptir. NOx emisyonları, butanol'ün daha yüksek buharlaşma ısısı nedeniyle de azaltılabilir (Rakopoulos *et al.* 2010). Bundan dolayı butanol'ün etanole nazaran çok fazla avantajı vardır ancak butanol üretimi çok azdır. Fakat son yıllarda geliştirilen butanol fermantasyon yöntemleri ile üretim oranı artmıştır (Jin *et al.* 2011).

1.3. N-Butanol Bileşiğinin Üretim Miktarları

Butanollerin dört izomeri, n-butanol, tert-butanol, sek-butanol ve izobutanol'dür. Butanol izomerlerinin tümü yanıcı olup boyalar ve incelticilerde çözücü olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda, butanoller benzin katkı maddeleri olarak kullanılmak üzere değerlendirilmektedir. Butil alkol, kapalı sistemlerdeki bütiraldehid'in katalize hidrojenasyonu ve damıtılmasıyla üretilir. 1997 yılında Birleşik Devletlerde 784 bin ton bütıl alkol üretilmiş ve bu amaçla 1,725 milyar pound (lb) bütiraldehit kullanıldığı tahmin edilmiştir (CEH-SRI 1999). 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ndeki üretimi 931 bin tondur. Batı Avrupa'da butil alkol dönüştürülmüş butiraldehit bazında 1997 üretimi yaklaşık 575 bin ton, 2002 yılı üretimi 610 bin ton olduğunu

bildirmişlerdir. Butil alkolün ABD'de üretiminin 784.000 ton, Batı Avrupa'da 575.000 ton ve Japonya'da 225.000 ton olarak tahmin edilmektedir (EPA 2006).

En son ABD Toksik Salım Envanterine (EPA) göre, 2010 yılında toplam 12,7 milyon lb butanol'ün doğaya yayılmış olduğu rapor edilmiştir (EPA 2010). Ayrıca, 2006 ABD EPA'sının Envanter Güncelleme Kayıtları, n- ve tert-butanol'ün yüksek miktarda üretilen kimyasallardan (1 milyar lb) olduğuna, sek-butanol ve izobutanol'ün ise diğer izomerlerine göre daha az miktarda üretilen (100-500 milyon lb) kimyasal maddeler olduğuna işaret etmiştir (EPA 2006).

1.4. N-Butanol Bileşiğine Maruziyet

İnsanların butanollere maruz kaldığı ana kaynak çoğunlukla mesleki alanlardır. Mesleki maruziyet, butanollerin üretildiği veya kullanıldığı iş yerlerinde teneffüs edilmesi ve dermal teması ile oluşabilir. Genel popülasyon, içme suyu, yiyeceklerin yutulması ve butanol ile kirlenmiş havanın solunması yoluyla butanollere maruz bırakılabilir. Ulusal İş Sağlığı Güvenliği Enstitüsü (NIOSH)'nün 1981'den 1983'e kadar yapılan araştırması ile 1.059.965; 171.420; 47.211; 256.975 işçinin sırasıyla potansiyel olarak n-butanol, tert-butanol, sek-butanol ve isobutanol'e maruz kaldığı belirlenmiştir (NIOSH 1990). Butanollerin yüksek miktarda salınması, yüksek üretim hacmi ve maruz kalma potansiyel nedeniyle, bu bileşiklerin toksisite etkilerini daha iyi anlamak önemlidir. Toksikolojik incelemelerde, farklı butanol izomerleri için gelişim süresince karaciğer, böbrek ve beyinde toksik etkileri olduğu bildirilmiştir. Bu butanollerin çoğuna maruz kalmış laboratuvar hayvanlarında nörotoksisite ve gelişimsel toksisite gözlenmiştir. ABD'de, bütıl alkolün fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle, endüstriyel ara ürün olarak imalat ve kullanım sırasında işyeri maruziyeti, kapalı işleme sistemleri ile sınırlanmaktadır. Aynı nedenlerle, bütıl alkolün bir çözücü olarak çeşitli ürünlerde kullanılması sırasında maruz kalma beklenmemektedir. Cilalar ve diğer kaplamalar gibi bütıl alkol içeren ürünlerin endüstriyel ve ticari uygulamaları sırasında soluma ve deri maruziyeti oluşabilir. Tüketici ürünlerinde kullanım sınırlıdır, ancak olası bir maruz

kalma kaynağıdır. Çevreye yapılan salınımlar öncelikli olarak çözücü kullanımı ile olmaktadır (ECETOC 2003a; ECETOC 2003b; OECD 2004; McGregor 2010).

Butil alkolün çevreye dolaylı olarak ulaşması, endüstriyel emisyonlardan veya atık alanlarından havanın etkilenmesi ile olabilir. Ayrıca çevresel maruziyet, az miktarlarda butil alkolün yüzey, içme veya kuyu sularına karışması ile mümkündür. Test amaçlı kullanılan evlerde butanolün havada ortalama 0,5 ppb ve 0,07-26 ppb arasında değiştiği tespit edilmiştir (Connor *et al.* 1985).

Butil alkol içeren piyasada 1096 ürün ve bu ürünleri tüketen 170 tüketici grubu olduğu tespit edilmiştir. Tüketici maruziyeti kullanıma bağlı olarak gıda ile alımı, teneffüs etme veya cilt ile temas yoluyla oluşabilir. Alkollü içkilerde karbonhidratların fermantasyonunun bir ürünü olarak butil alkol doğal olarak oluşur (Bikfalvi and Pasztor 1977; Woidich *et al.* 1978; Postel and Adam 1978; Bonte 1978, 1979; Schreier *et al.* 1979). Ayrıca peynir, ısıtılmış süt, pişmiş pirinç ve kavun gibi çeşitli gıdalarda uçucu olduğu belirlenmiştir (Jaddou *et al.* 1978; Dumont and Adda 1978; Yajima *et al.* 1978). Kızarmış mısır ve pamuk tohumu yağından butil alkol üretilbildiği de bildirilmiştir (Chang *et al.* 1978).

1.5. N-Butanol Bileşiğinin Toksik Etkileri

Su içindeki n-butanolün buharlaşma ile yarılanma ömrünün, dereler için 2.4 saat, nehirler için 3.9 saat ve göller için 126 gün olduğu tahmin edilmektedir. N-Butanol balıklar, amfibiler, suda yaşayan omurgasız hayvanlar, bitkiler, algler, bakteriler ve protozoonlarda için düşük toksisite gösterir. Bununla birlikte, bazı algal türler n-butanol'e karşı hassasiyet göstermektedir. Sucul yaşam için akut toksisitesi 500 mg/L'den büyük konsantrasyonlarda ortaya çıkabilir. N-butanol için mevcut veriler, 100 mg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarda suda akut toksisiteye neden olabileceğidir. N-Butanol, aerobik koşullar altında "kolayca biyolojik olarak parçalanabilir" olarak sınıflandırılmıştır. N-butanol için oktanol: su katsayısı (log Kow) 0,88-0,97 arasında hesaplanmıştır (Howard *et al.* 1990; OECD 2001).

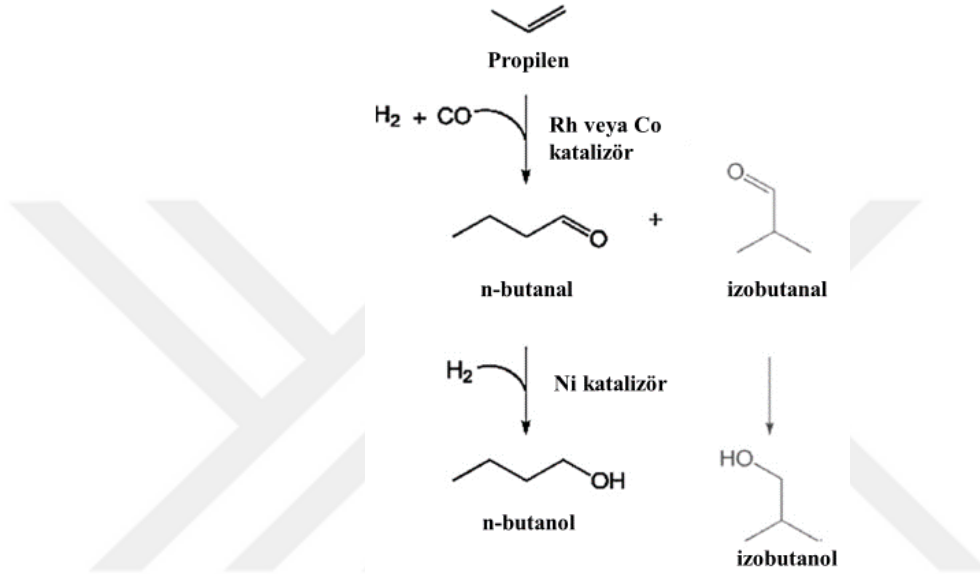
N-butanolün balıklar üzerine toksisitesini değerlendiren sekiz çalışma tespit edilmiştir. Yassı kafalı golyan balıkları (*Pimephales promelas*) 96 saat n-butanole maruz bırakıldıklarında LC₅₀ değeri 1376 mg/L (Wong *et al.* 1998) ve 1940 mg/L (Mattson *et al.* 1976) arasında değiştiği tespit edilmiştir. Tatlısu kefalleri (*Semotilus atromaculatus*) statik bir sistemde 24 saat süresince n-butanole maruz bırakıldığında LC₁₀₀ değeri 1400 mg/L olduğu bildirilmiştir (Gillette *et al.* 1952). Kırmızı havuz balıklarına (*Carassius auratus*) statik sistemde 24 saat n-butanol uygulandıktan sonra LC₅₀ değeri 1900 mg/L olarak belirlenmiştir (Bridie *et al.* 1979). Altın orfe balığı (*Leuciscus idus melanotus*) ile 48 saatlik statik test sonucunda LC₅₀ değeri 1200-1770 mg/L arasında bulunmuştur (Juhnke and Lüedeman 1978). İnci Balıkları (*Alburnus alburnus*) 96 saatlik statik testlerde n-butanol'e maruz bırakıldığında LC₅₀ değeri 2250 mg/L olarak tespit edilmiştir (Linden *et al.* 1979; Bengtsson *et al.* 1984). Japon pirinç balığı (*Oryzias latipes*) olarak bilinen akvaryum balıklarına statik sistemde 48 saat boyunca n-butanol uygulanmış ve LC₅₀ değeri 500-1000 mg/L olarak belirlenmiştir (Tsuji *et al.* 1986).

Bütil alkol (BA), deney hayvanlarında akut oral, dermal veya inhalasyon maruziyetini takiben çok az toksik olduğu tespit edilmiştir. Dişi sıçanlarda oral yolla akut uygulamada LD₅₀ değerleri 790-4360 mg/kg arasında değişir (Union Carbide Corporation 1951; Jenner 1964; Purchase 1969). Tavşanlarda yapılan çalışmada dermal LD₅₀ değerinin 3402 mg/kg olduğu ve bu da BA'nın deriye nüfuz edebildiğini, ancak çok kolay olmadığını göstermiştir (Patty 1948; Union Carbide Corporation 1951).

1.6. N-Butanol Bileşiğinin Metabolizması

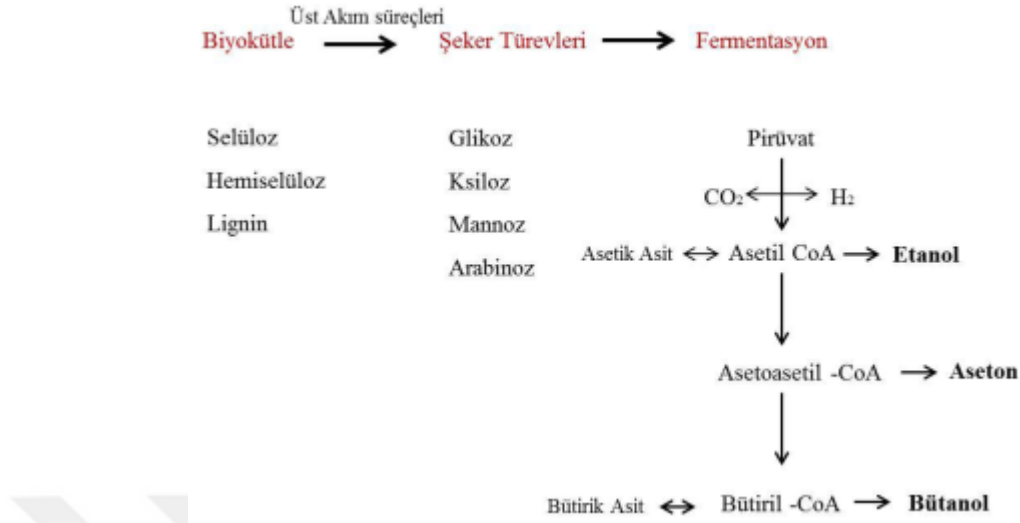
Kimyasal yöntemler ile n-butanol üretimi üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşama; okso sentezidir. Okso sentezi, hidroformilasyon olarak da bilinmektedir ve bu aşamada, yüksek basınç altında, kobalt (Co), rodyum (Rh) ve rutenyum (Ru) gibi katalizörler aracılığı ile alkenlerden, aldehit üretimi yapılmaktadır. Ortamda bulunan propilene, karbon monoksit (CO) ve hidrojen (H₂) eklenerek, n-bütiraldehit ve iso-bütiraldehit elde edilmektedir. Daha sonra, bu aldehit karışımlarının, hidrojenasyonu ile, n-butanol ve iso-butanol üretimi gerçekleştirilmektedir (Hahn *et al.* 2010). Üçüncü aşama ise,

krotonaldehit hidrojenasyonudur. Bu süreçte, asetaldehitden aldolizasyon ile asetaldol oluşuktan sonra dehidratasyon ile krotonaldehit elde edilir ve elde edilen krotonaldehitin hidrojenasyonu ile n- butanol oluşur (Şekil 1.1) (Weissermel and Arpe 2004; Hahn *et al.* 2010).



Şekil 1.1. N-Butanol üretiminin kimyasal yolu (Jin *et al.* 2011)

N-Butanol'ün biyokimyasal üretimi ise, fermentasyon veya ABE (Aseton-Butanol-Etanol) fermentasyonu olarak da bilinen süreç ile olmaktadır. Bu süreçte, tarımsal ve endüstriyel atıkların yan ürünleri ve kalıntıları hammadde olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.2) (Qureshi *et al.* 2013). Fermentasyon öncesinde hammaddelere, fiziksel (ezme, öğütme veya ufalama), fizikokimyasal (buharla veya amonyum fiberle genleştirme ve sıcak su ile muamele), kimyasal (seyreltilmiş ya da konsantre asit hidrolizi, alkali hidroliz ve oksidatif delignifikasyon) ve biyolojik (mantarlar ile muamele) yöntemler gibi ön işlemler yapılmalıdır (Jorgensen *et al.* 2007; Kumar *et al.* 2009).



Şekil 1.2. Klostridial fermentasyonun metabolik yolu (Qureshi *et al.* 2010).

N-Butanol üretiminin biyolojik sentezi olan ABE fermentasyonu, *Clostridium* bakterileri tarafından gerçekleştirilmektedir (Lee *et al.* 2008). Bu bakteriler, gram pozitif, anaerobik bakterilerdir. Yavaş büyürler ve yaşam döngüsünde spor formda olmaları endüstriyel açıdan sorun yaratmaktadır. Ayrıca, fermentasyon sırasında meydana gelen, bütirat, aseton ve etanol gibi yan ürünler, n-butanol üretiminin kontrol edilmesini zorlaştırmaktadır (Jones and Woods 1986). İlave olarak, n-butanolü ve oksijeni tolere etme yeteneklerinin düşük olması bu organizmalarda ABE fermentasyonunun geliştirilmesini engellemektedir. Bu sebeple, endüstriyel açıdan n-butanol üretimini destekleyici *Escherichia coli* veya *Saccharomyces cerevisiae* gibi başka organizmalar kullanılmaya çalışılmaktadır (Peralta-Yahya *et al.* 2012).

Genellikle butanol, petrokimyasal hammaddelerden kimyasal yöntemler ile üretilmekte ve üretilen butanol'ün çoğu, cila, boya ve sıva üretimi için gerekli olan bütıl akrilat ve metakrilat esterleri oluşturmak için ara bileşik olarak kullanılmaktadır (Kirschner 2006). Butanolün son yıllarda gündeme gelen yeni ve önemli bir uygulaması da içten yanmalı motorlarda doğrudan veya benzinle çeşitli oranlarda karıştırılarak yakıt olarak kullanılmasıdır (Ni and Sun 2009). Butanole olan bu ilginin artışı, araştırmacıları, alternatif butanol üretim yolları ile ilgili araştırmalara yönlendirmektedir.

Butanol üretim yolağına bakıldığı zaman, Asetil Koenzim A (CoA)'yı, butanole dönüştürmede altı adet temel enzimin görev aldığı belirtilmektedir. Bu enzimler; tiyolaz (thl), 3-hidroksibütiril-CoA dehidrogenaz (hbd), krotonaz (crt), bütiril-CoA dehidrogenaz (bcd), bütiraldehit dehidrogenaz ve butanol dehidrogenaz (bdh)'dır (Huang *et al.* 2010). Tiyolazlar, asetil-koenzim A asetiltransferazlar (ACAT) olarak da bilinmektedirler ve asetil-CoA'yı asetoasetil CoA'ya dönüştürürler. 3-hidroksibütiril-CoA dehidrogenaz EC 1.1.1.157, 3-hidroksibutanol-CoA ve NADP'yi kullanarak, 3-asetoasetil-CoA'ya dönüştürmekte ve ilave olarakta NADPH ve H⁺ oluşturmaktadır (Madan *et al.* 1973). Bütiril CoA dehidrogenaz (EC 1.3.99.2), bütiril CoA'yı, 2-butanol CoA'ya dönüştürmektedir (Engel and Massey 1971). Butanol dehidrogenaz, butanol oluşumunun son aşamasında görev alan bir enzimdir (Palosaari and Rogers 1988). Ayrıca, butanol ve diğer alkollerin sentezinde görev alan anahtar enzimlerden ikisi de alkol dehidrojenaz (Adh1) (EC 1.1.1.1, 1.1.1.2, veya 1.1.171) ve aldehit dehidrogenaz (EC 1.2.1.10)'dır (Krivoruchko 2013).

1.7. Zebra Balığının (*Danio rerio*) Genel Özellikleri

Zebra balığının taksonomisi

Phylum : Chordata

Subphylum : Craniata

Classis : Osteichthyes (Kemikli balıklar)

Superordo : Teleostei

Ordo : Ostariophysoidei

Subordo : Cyprinidae

Familya : Cyprinidae

Genus : *Danio* (= *Branchydanio*)

Species : *Danio rerio* (Zebra balığı), (Hamilton 1822).

Zebra balığı (*Danio rerio*), sazangiller (Cyprinidae) familyasından, doğal yaşam alanı Asya olan, yaklaşık 4-6 cm boyunda, tropikal bir balık türüdür. Zebra balıkları (*D. rerio*) gelişim biyolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Kolay temin

edilebilirliği, ucuz oluşu, kolay yetiştirilmesi, şeffaf yumurta ve embriyonik döneminden dolayı tercih edilirler. Zebra balıkları, yüksek fekonditeye sahip olmaları ve yıl boyunca bir dişinin tek seferde yaklaşık olarak 50-200 arası yumurta bırakması da model organizma olarak kullanılmalarındaki diğer bir önemli nedendir (Laale 1977). Model organizma olarak zebra balıkları pek çok çalışmada omurgalı ve insan ile homolog genlere sahip olması hem toksikoloji hem de hastalık araştırmalarında kullanılmalarını sağlamaktadır. Ayrıca diğer deney hayvanlarında gözlemlenme olanağı zor olan embriyonik dönemdeki etkilerin belirlenmesi içinde zebra balıkları alternatifsizdir.

1.8. Zebra Balığının Hayat Döngüsü ve Gelişimi

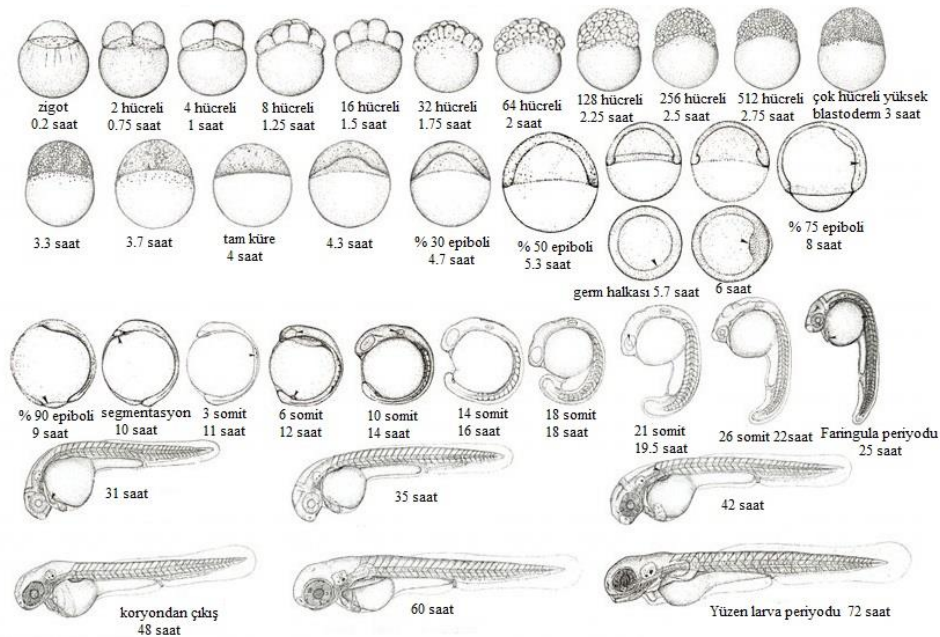
Zebra balığı embriyo ve larva yaşam döngüsü zigot, hücre bölünmesi (yarılma), blastula, gastrula, segmentasyon, faringula, koryondan çıkma ve erken larva safhası olmak üzere sekiz periyot şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 1.3). Zigot evresi, ilk zigotik hücre döngüsünün tamamlanmasıyla yeni döllenmiş yumurtada sitoplazmanın blastodiklerin oluşması için animal kutuba doğru hareketi ile başlar. Zigot, yaklaşık 0,7 mm çapındadır (Hisaoka and Battle 1958). Fertilizasyondan sonra yaklaşık 40 dakika sonra ilk bölünmenin gerçekleştiği hücre bölünmesi evresinde, ilk bölünmeden sonra hücreler veya blastomerler yaklaşık 15 dakika aralıklarla bölünürler. Sitoplazmik bölünmeler meroblastiktir (Kimmel and Law 1985).

Blastula evresi (2.3-5.3 saat), 128 hücreli evre veya sekizinci zigotik hücre döngüsünde blastodiklerin top gibi görünmeye başladığı ve gastrulasyonun başladığı zamana kadar olan süredir. Blastula döneminde yumurta sinsityal tabakasının (yoğun hücre içeren yüzey tabakası) oluşması ve epibolinin başlaması gibi önemli süreçler ortaya çıkar. Epiboli, gastrulasyon evresi döneminde de devam eder (Kimmel *et al.* 1995). Koryonun kalınlığı yaklaşık 10 µm olup 1,5 µm çapında sirküler porlara sahiptir. Bu koryonik yüzey su ve elektrolitlerin perivitellin aralığa girmesini sağlar (Laale 1977). Yumurta hücresinin kendisi biraz elipsoidal yapıdadır ve çapı 0,55-0,60 mm kadardır (Şişman 2007).

Gastrula evresinde (5.3-10 saat) epiboli devam ederken morfogenetik hücre hareketleri, primer germ tabakaları ve embriyonik eksen oluşur. Embriyonun involüsyon (içe kıvrılması) başlangıcı yani %50 epibolinin olduğu süreç gastrulasyonun başlangıcını tanımlamaktadır (Kimmel *et al.* 1995).

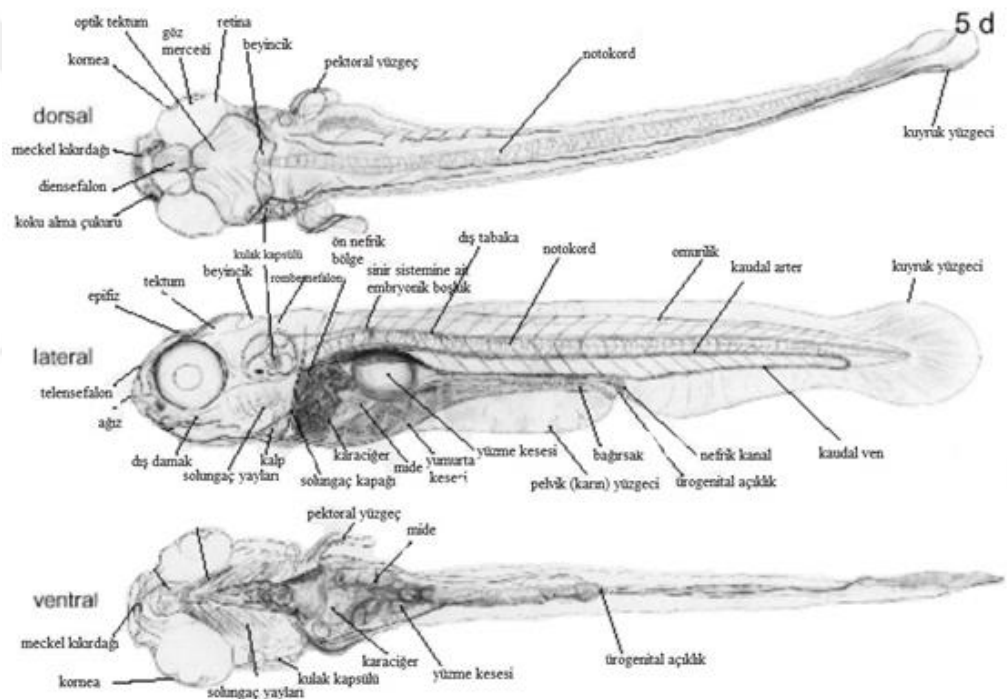
Segmentasyon evresinde (10-24 saat) morfolojik hareketler oluşur, somitler gelişir, birincil organların temelleri görünür hale gelir, kuyruk tomurcuğu daha belirgindir ve embriyo uzar. Embriyonun eksenini hemen hemen vitellüs kütesinin etrafını saran yarı şeffaf bir kabartma çizgisi (sırt) olarak fark edilebilir. İlk somitin oluştuğu evredir. Optik veziküller ve Kupffer vesikül gelişmeye başlar. Döllenmeden yaklaşık 14-16 saat sonra optik veziküller net bir şekilde ortaya çıkar (Kimmel *et al.* 1995).

Faringula evresi (24-48 saat), sindirim sisteminin gelişiminden dolayı bu periyoda faringula periyodu da denmektedir. Bu evrede kalp atışı başlar ve somitler tamamlanır. Dolaşım, pigmentasyon ve yüzgeçlerin gelişimi başlar. Sinir sistemi öne doğru genişler ve serebellar morfogenezi hızlanır. Solungaç kemerleri, operkulum ve dişlerde bu evrede oluşmaya başlar (Kimmel *et al.* 1995).



Şekil 1.3. Zebra balığı embriyosu gelişim döngüsü (Kimmel *et al.* 1995)

Koryondan çıkma evresi (48-72 saat), zebra balığı embriyolarında koryondan çıkış bu evrede başlar ancak eşzamanlı bir çıkış söz konusu değildir. Birincil organ sistemlerinin morfogenezi tamamlanır. Baş ve pektoral yüzgeç kıkırdak gelişimi oluşur. Küçük ağız açıklığı gözlerin arasında orta-ventral kısıma yerleşir. Dişler ve solungaç kemerleri bu evrede tamamlanır (Kimmel *et al.* 1995). Baş bölgesinde başlayan yaygın bir sarı renklenmenin sonucu olarak ksantoforlar belirlemekte ve tüm embriyonun kaudal kısmına doğru yayılmaktadır. Pigmentasyon yoğunudur ve melanofor yıldızları zebra balığının karakteristik çizgileri şeklinde düzenlenir (Şişman 2007).



Şekil 1.4. Zebra balığı larvasının 96. saatteki anatomik yapısı (Haffter *et al.* 1996)

Erken larva evresi (72-120 saat), larva aktif olarak yüzmeye başlar. Yüzme kesesi şişmeye başlar ve morfogenezini çoğunu tamamlanır. Besin kesesinin çekilmesiyle larvanın besin arayışı başlar. Ağız açıklığı artar ve anterior-dorsal de çıkıntı şeklini alır (Haffter *et al.* 1996).

Zebra balıklarında erkeklerde karın düz olduğundan dişiye oranla daha ince ve küçük görünürler. Vücut rengi gümüşü siyah olup boydan boya 7-9 tane mavi çizgi bulunur. Erginleşmemiş erkek ve dişilerin ayırt edilmesi belirsiz eşey karakterlerinden dolayı çok zordur. Ancak cinsi olgunluğa erişen erkeklerin dişiye nazaran daha büyük, sarı-turuncu renkte anal yüzgece sahip olmaları ve dişilerin karın bölgesi oldukça şişkin olması ile dişi-erkek ayrımı yapılabilir (Schilling 2002; Şişman 2007; Spence *et al.* 2008).

Bu ovipar tür orijinal ortamından uzakta tanklar içinde kolaylıkla yetiştirilebilir. Yaşam koşulları bakımından 20-32°C arasındaki sıcaklıklarda yaşayabilirler. Bu balıklar için en ideal su ısısı 25-26°C'dir. Nötr sulardan hoşlanırlar ve pH 6,5-7,2 arasındaki sular bu balıklar için uygundur. Normal çeşme suyu konmuş akvaryumlarda bol havalandırma koşullarında rahatça yaşarlar. Besin ve ısı, yumurtlamaya hazırlanacak balıklar için önemli faktörlerdir. Bu balıklar omnivor olup kuru veya dondurulmuş normal balık yemi, plankton, *Paramecium*, beyaz solucan, sivrisinek larvası, Tubifex, *Daphnia* gibi çeşitli besinleri alırlar (Laale 1977).

İlk yumurtlama dişiler standart uzunluk olan 24,1 mm'ye ulaştıklarında gerçekleşir. Bu uzunluğa 25,3-25,7°C'de 74-75 günlük bir kültürden sonra ulaşırlar. Yumurtlama zamanı fotoperiyot ile yakından ilişkilidir. 14 saat aydınlığı takiben 10 saatlik bir karanlık yeterlidir (Hallare *et al.* 2005). Bir dişiye 3-4 erkek olacak şekilde yapılan çiftleştirmelerden 26°C'de 250-500 yumurta elde edilebilir. Yapışkan olmayan, transparan ve dibe çöken bu yumurtalar embriyolojik çalışmalar için çok uygundur. Çünkü gelişme periyodu fertilizasyondan (döllenmeden) koryondan çıkışa kadar yaklaşık 96 saattir (Laale 1977).

Zebra balıklarında fertilizasyondan yaklaşık 24 saat sonra kalp kasılması başladığında kalpte atriyal kalp kas hücreleri, ventriküler kalp kas hücreleri ve endokardial hücreler olmak üzere üç hücre tipi oluşur. Bu farklı hücre tiplerine blastulanın lateral marjinal zonunda 5.saatte oluşan kardiyak progenitör hücreler öncülük etmektedir. Bu progenitör hücreler 15.saate kadar anterior lateral mesoderm posterioruna göç eder. Bu bilateral progenitör hücreler farklılaşmaya başlayarak endokardial, ventrikül ve atriyal hücreleri

disk şeklinde merkezde toplanır. Bu disk uzayarak lineer bir tüp şeklini alır. Böylece ilk kalp alanı bu hücreler tarafından oluşturulmuştur. Daha sonra kardiyak hücreler farklılaşmanın ikinci dalgası ile kalp tüpünün ikinci alanını oluştururlar. İkinci alan fertilizasyondan yaklaşık 24 saat sonra oluşur. İkinci kalp alanı arterial ve venöz porlarının oluşması ile genişlemektedir. Lineer kalp tüpü sol yönde göçe başlar ve kıvrılır. Kıvrılmış kalp perikardial boşluğa yerleşir ve kalp iki odacığa ayrılır. Kalbin büyük bir bölümü 48. saatte şekillenmesine rağmen hala tam olarak gelişimini tamamlanamamıştır. Organizmanın büyüme fonksiyonunda önemli rolü olan bulbus arteriosus, valf kapakcıkları, yastıkcıklar, epikardiyum ve trabeküla gibi miyokardial çıkıntılar ve yardımcı (auxiliary) hücre tipleri eksiktir (Chen *et al.* 1997; de la Pompa *et al.* 1998; Trinh and Stainier 2004; Keegan *et al.* 2004; Bussmann *et al.* 2007; Holtzman *et al.* 2007; Rohr *et al.* 2008; Baker *et al.* 2008; de Pater *et al.* 2009; Martin and Bartman 2009; Grimes and Kirby 2009; Milgrom-Hoffman *et al.* 2011; Lazic and Scott 2011; Hofsteen *et al.* 2013). Zebra balıklarında kalbin dış bölgesi bulbus arteriosus ve aorttan oluşur. Fertilizasyondan 72 saat sonra proepikardiyum genişleyerek epikardiyumu oluşturmak için miyokardiyal yüzeye yayılmaya başlar (Kikuchi *et al.* 2011; Peralta *et al.* 2013; Plavicki *et al.* 2014).

Memeliler ile karşılaştırıldığında, zebra balıkları eşsiz bir hepatik anatomi ve hücresel yapıya sahiptirler. Zebra balıklarının karaciğerleri 3 lobtan oluşur (2 yanal ve 1 ön). Bu loblarda memelilerdeki lobları birbirinden ayıran pedinkül yapısı yoktur. Karaciğerlerinde portal yapı yerine hepatositler tübüler yapı şeklinde düzenlenmiştir (Hinton and Couch 1998).

Omurgalılarda sinir sistemi ektoderm tabakası tarafından oluşturulmaktadır. Dorsal ektodermin bir kısmı nöral ektodermi oluşturmak üzere özelleşir ve hücreleri silindirik görünümüyle fark edilir hale gelir. Embriyonun bu bölgesine nöral plak denir. Nöral plak dokusunun nöral tüpü (merkezi sinir sisteminin rudimenti) oluşturması olayına nörolasyon denir ve bu değişimleri geçiren embriyoya nörola denir. Nöral tüp anteriorde beyni ve posteriorde omuriliği oluşturur (Patten 2008). Zebra balığı nöral tüp, gözler erken oluşsa da memeli nöral tüplerine benzer bir farklılaşma yolu

takip eder (Lowery and Sive 2005). Zebra balığı embriyolarında beyin gelişimi incelendiğinde fertilizasyondan sonra 9. saatte %90 epibolinin olduğu gastrulasyon evresinde beyin bölgesi kalınlaşır ve segmentasyon evresinde 16. saatte beyin nöromeri oluşur. Zebra balığı embriyolarında fertilizasyondan sonraki 16. saatte beyin dört önemli alt bölümü kolayca ayırt edebilir. Bu bölümler telensefalon (ön beyin), diensefalon, mezensefalon (orta beyin) ve rombensefalon (arka beyin) dur (Hanneman *et al.* 1988).

1.9. Zebra Balığının Model Organizma Olarak Kullanılmasının Avantajları

Balık gelişiminin araştırılmasının önemi birçok balık türünün ekonomik öneme sahip olması ve balıkların çevresel değerlendirmelerde indikatör olarak kullanılmalarındandır. Kimyasal toksisitesinin belirlenmesinde kullanılan en yaygın laboratuvar türleri zebra balığı, Japon medaka, yassı kafalı golyan balığı ve gökkuşağı alabalığıdır.

Zebra balıklarında fertilizasyondan 24 saat sonra, embriyonik kalp, kalp kasılması ile başlar. Zebra balığı kalbi, insan kalbi ile karşılaştırıldığında daha basit yapıdadır. Zebra balıklarında insanlardan farklı olarak kalp 4 yerine iki odacıktan oluşur. Ancak insan kalbinin zebra balığı kalbi ile moleküler ve hücrel benzerlikleri vardır (Stainier *et al.* 1993; Moorman and Christoffels 2003).

Kardiyovasküler hastalıklarda hayvan modelleri hastalığın korunmuş moleküler ve genetik temelini tanımlamak için kilit rol oynar. Zebra balıklarının kardiyak morfogenezisi insan kalp hastalıkları ile paralel durumlara sahiptir (Brown *et al.* 2016). Zebra balığı embriyoları yaşamlarının ilk haftaları çok az miktarda olan oksijen ihtiyaçlarını difüzyon yoluyla karşıladıkları için işlevsel bir kardiyovasküler sisteme gereksinimleri yoktur (Bang *et al.* 2004).

Karaciğer ile ilgili hastalıkları dünya genelinde en fazla ölüme neden olan hastalıklardan olduğu için bu hastalıkların teşhisi, tedavisi ve önlenmesi için acilen yeni metodlara ihtiyaç duyulmaktadır. Zebra balıkları 80 yıldan fazla bir süredir birçok

araştırma için model organizma olarak kullanıldığı gibi uzun yıllardır karaciğer ile ilgili araştırmalarda da kullanılmaktadır (Stanton 1965; Laale 1971; Braunbeck *et al.* 1990; Sadler *et al.* 2005; Amali *et al.* 2006; Sadler *et al.* 2007; Goessling *et al.* 2008; Passeri *et al.* 2009; North *et al.* 2010; Nguyen *et al.* 2012; Yin *et al.* 2012; Liu *et al.* 2012). Bu çalışmalar ışığında zebra balıkları kullanılarak karaciğer rejenerasyonu, karaciğer kanseri, toksin maddelere bağlı karaciğer hasarı, karaciğer yağlanması ve kalıtsal karaciğer bozuklukları hakkında daha çok bilgi elde edilebilir.

Hızlı ve dış gelişim göstermelerinden dolayı zebra balığı embriyoları organ gelişimi ve farklılıklar ile ilgili çalışmalarda avantaj sağlamaktadır. Ayrıca zebra balıklarında tüm hepatik fonksiyonlar fertilizasyondan sonraki 5. günde değerlendirilebilir. Zebra balıklarının karaciğer ve diğer iç organları basit bir mikroskop ile kolaylıkla gözlemlenebilir (Goessling and Sadler 2015). Hepatik bağışıklık hücreleri (örneğin; kupffer hücreleri) hariç olmak üzere memeli karaciğerindeki diğer hücre tipleri zebra balıklarında tespit edilmiş olup safra salgısı, glikojen, lipid depolama, insülin duyarlılığı, ksenobiyotik ve amonyak metabolizmasının yanı sıra bazı serum proteinlerinin salgısı gibi fonksiyonları da benzerlik göstermektedir (Braunbeck *et al.* 1990; Noël *et al.* 2010; Howarth *et al.* 2013; Goessling and Sadler 2015).

Zebra balıkları canlı embriyoları nöronların görsel olarak incelenmesi ve genetik analizler için uygunluğu ile dopaminerjik sistemin çalışılması için muhteşem bir olanak sağlar. Ayrıca zebra balıkları ön beyin bölgesi memelilerin izokorteks ve hipokampus yapıları ile homolojisinin yüksek olması sebebiyle karşılaştırmaya çok uygundur ve zebra balığı beyin gelişimi fertilizasyondan sonraki 5. günde tamamlanması sinir sistemi ile ilgili çalışmalarda kısa süredeki beyin gelişimi ile kolaylık sağlar (Wullimann and Mueller 2004). Alkolün nörobiyolojik mekanizmaların çoğunu etkilediği bilinmektedir (Vengeliene *et al.* 2008). Buna ek olarak alkolün dopaminerjik ve serotoninerjik sistemler gibi büyük nörotransmitter sistemlerin de fonksiyonlarını değiştirdiği tespit edilmiştir (Sari and Gozes 2006; Buske and Gerlai 2011; Chatterjee *et al.* 2014; Fernandes *et al.* 2015). Bu literatür bilgilerine bakılarak alkolün beyin üzerine

etkilerinin araştırılmasında zebra balığı embriyolarının ne kadar uygun bir hayvan modeli olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada n-butanol'ün zebra balıklarındaki teratojenik etkilerin tespit edilmesi ve nörotoksik etkilerin belirlenmesi ile bu kimyasalın insan, memeli ve diğer omurgalılarda oluşturması muhtemel etkiler hakkında bilgilendirme yapılabileceği düşünülmüştür. N-Butanol'ün gıda ve sanayi alanlarında kullanımı göz önünde bulundurularak insanlar üzerinde oluşturabileceği toksik etkilerin tahmin edilmesine olanak sağlamak ve gebeliğin erken dönemlerinde alınan n-butanol'ün direkt olarak embriyo üzerine olan etkisiyle organlardaki gelişim üzerine ve hücrelerdeki toksik (zehirli) etkisiyle merkezi sinir sistemi üzerine etkileri, model organizma olarak zebra balığı embriyo ve larvalarının kullanılması ile belirlemek amaçlanmıştır Ayrıca n-butanol'ün etki mekanizmasının desteklenmesi noktasın da literatüre katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

McLaughlin *et al.* (1964) tavuk yumurtalarına farklı dozlarda (0, 80, 160, 240, 320, 480 ve 640 mg/yumurta) n-butanol enjekte etmişlerdir. Tavuk yumurtalarında 320 and 480 mg/kg dozlarda katarakt ve sinirlerde hasarların arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca 640 mg/kg doz uygulamasında yumurtadan çıkışın olmadığını belirlemişlerdir.

Farelere oral yolla sıvı diyetle bağlı tert-butanol %0, 0.50, 0.75, 100 (w / v) şeklinde uygulanmıştır. Lokomotor aktivitenin arttığı ve fetüslerin göz gelişiminin geciktiği bildirilmiştir (Daniel and Evans 1982). Ayrıca farelerde yapılmış benzer bir çalışmada da oral yolla süt formülasyonu ile tert-butanol uygulaması sonrasında farelerde beyin ağırlığında azalma tespit edilmiştir (Grant and Samson 1981).

Arendt *et al.* (1988) sıçanlara, 12 hafta boyunca etanol verilmiş (%20 v/v) ve sonra ön beyin bölgesinde (Meynert'in basal çekirdeği) asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin %81 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca asetilkolinesteraz (AChE) pozitif nöron miktarında da %83 oranında azalma tespit etmişlerdir. Böylece kronik alkol alımına bağlı olarak ön beyin bölgesinde nöral kaybın artışına bağlı olarak kolinerjik sistemdeki dengenin bozulması ile bunama ve Alzheimer gibi bellek işlev bozukluğuna dayanan hastalıkların oluşabileceğini belirtmişlerdir.

Oral yolla sıçanlara 28 hafta boyunca farklı zamanlarda etanol uygulanması (%20 v/v) sonrasında asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin, bazal ön beyinde zamana bağlı bir azalma gösterdiğini bildirmişlerdir (Arendt *et al.* 1989).

Nelson *et al.* (1989b) sıçanlara inhalasyon yolu ile 0, 3500, 6000, 8000 ppm 6 hafta, günde 7 saat maruz bırakmışlardır. Maruz kalmış sıçanlarda beyin ventrikülü kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde genişlediğini tespit etmişlerdir. Aynı etkileri sec-butanol (0, 3500, 5000, 7000 ppm dozları günde 7 saat) ve tert-butanol'ün (0, 2000, 3500, 5000 ppm dozları günde 7 saat) uygulanması sonrasında da gözlemlemişlerdir.

Nelson *et al.* (1991) çalışmalarında dişi ve erkek sıçanlara (n=15) inhalasyon yolu ile 0, 6000, 12,000 ppm dozlarında tert-butanol günde 7 saat ve 6 hafta uygulanmış olup orta beyinde serotonin, beyincikte norepinefrin ve β -endorfin düzeylerinde belirgin düşüş belirlenmiştir.

Sitarek *et al.* (1994) sıçanlara içme suyu ile n-butanol'ün farklı dozları (0, 300, 1000, 5000 mg/kg/gün) 8 hafta boyunca vermişler ve 300 mg/kg-gün maruz bırakılan sıçanlarda beyin ödem artışı gözlemlenmiştir.

NG108-15 hücre hattı (nöroblastoma $\times$ glioma hücre hattı) NG108-15 hücreleri, insan osteojenik protein-1 (hOP-1) ile muamele edildikten sonra 2 gün boyunca 5 mM n-butanol maruz bırakılmıştır. NG108-15 hücre hattında %63 kümelenme (hücre yapışması ölçümü) belirlenmiştir. Ayrıca 5 mM n-butanol ile iki günlük bir muamele sonrasında kümeleşme yüzdesini %35,6'ya düştüğü ve nöronal hücre adezyonunu inhibe ettiğini ortaya çıkarmışlardır (Charness *et al.* 1994).

İnsan L1 CAM (hücre adezyon molekülü) ile inkübe edilen NIH 3T3 (fare fibroblastları) hücreleri, 30 dakika için 2 mM n-butanol ile muamele edilmiş. Yapışık hücrelerin yüzdesi, kontrol de yaklaşık %70 iken 2 mM n-butanol ile muamele edilen hücrelerde yaklaşık %35'e düştüğünü belirlemişlerdir (Ramanathan *et al.* 1996). Benzer bir çalışmada NG108-15 ve NIH 3T3 hücrelerine 2 mM n-butanol uygulandığında her iki hücre hattındaki hücre adezyonunun maksimum inhibisyonunun (yaklaşık %55-60 inhibisyon) olduğunu tespit etmişleridir (Wilkemeyer *et al.* 2000).

Ikonmidou *et al.* (2000) hipotezine göre merkezi sinir sistemi hücrelerinden, insanlardaki fetal alkol sendromu ile ilişkili olan nörodavranışsal etkiler ve beyin hücre miktarındaki azalma sorumludur. Zebra balıklarındaki çalışmalarda öğrenme eksikliklerine neden olan etanol konsantrasyonlarının AO (akridin oranj) ile boyanmış hücrelerin sayısındaki istatistiksel olarak önemli farklılıkların olmaması, etanol kaynaklı merkezi sinir sistemi hücre ölümünün öğrenme ve hafıza üzerindeki etkisini ortadan kaldırmadığını bildirmişlerdir.

Prenatal yoldan (doğum öncesi) alkole maruz bırakılan sıçanların beyinlerinde önemli miktarda apoptozis meydana gelir ve etanol maruziyetinin neden olduğu nörodejenerasyonda apoptotik yolağın etkili olduğu düşünülür (Olney *et al.* 2000; Olney *et al.* 2002).

Apoptoz normal biyolojik süreçlerde ve omurgalılarda patogeneze önemlidir. Kaspazlar ve diğer apoptoz düzenleyici genler, zebra balığı (*Danio rerio*) ve diğer balık türlerinden klonlanmıştır. Apoptozun *in vivo* fonksiyonlarının açıklanması gelişim, morfogenez ve cinsiyet farklılaşması üzerine odaklanmıştır. Zebra balığı embriyolarında stres kaynaklı apoptoz, TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling, DNA kırıklarının *in situ* olarak belirleme) boyaması ve kaspaz tahlili ile izlenebilir. Dolayısıyla, zebra balığı *in vivo* apoptozun araştırılması için yararlı bir deneysel model hayvandır (Yamashita 2003).

Bilotta *et al.* (2004) zebra balıklarının embriyoları %1,5 ve %2,9 etanole maruz bırakılmış ve 0-8, 6-24, 12-24 ve 48-72. saatlerdeki anatomik ölçümler (göz çapı, kalp atış hızı) gruplar arasında karşılaştırmışlardır. Çalışmada %2,9 etanole maruz kalan embriyolarda çok fazla fiziksel bozukluklar ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında yüksek mortalite oranı tespit etmişlerdir. Kontrol ile karşılaştırıldığında 0-8. saatlerde %1,5 konsantrasyonundaki embriyolarda daha küçük göz çapı ve daha düşük kalp atış hızı olduğunu bildirmişlerdir.

Carvan *et al.* (2004) zebra balığı embriyolarını fertilizasyondan sonra 4. saatten 6. güne kadar etanole (0, 3, 10, 30, 100 ve 300 mM) maruz bırakmışlardır. Gelişme esnasında etanole maruz kalma, doğum öncesi ve doğum sonrası büyüme ve gelişme geriliği ile sonuçlanan konjenital anormalliklere, merkezi sinir sisteminde, kardiyovasküler sistemde, yüz yapısında, kol ve bacaklarda eksikliklere neden olduğunu tespit etmişlerdir. Etanole maruz bırakılan 24. saatteki embriyolarda AO (akridin oranj) boyama yapılarak merkezi sinir sistemindeki hücre ölümleri değerlendirilmiştir. Etanole maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında AO ile boyanmış hücrelerin sayısında doza bağlı artış sadece 30 mM konsantrasyonunda tespit etmişlerdir.

Watanabe *et al.* (2004) fare serebellar granül nöron hücre kültürü kullanmışlardır. Hücrelere, hücre adhezyonu (tutunma) ve aksonların aşırı büyümesini incelenmek için 30 dakika 0-27 mM n-butanol ile muamele etmişlerdir. Hücrelere 27 mM n-butanol uygulamasından sonra akson büyümesinin inhibe edildiğini tespit etmişlerdir.

Ema *et al.* (2005) sıçanlara 20 gün boyunca içme suyu ile farklı dozlarda (0, 316, 1454, 5654 mg/kg/gün) n- butanol verilmiş ve yavrularında gelişimsel toksisite olmadığını bildirmişlerdir.

Reimers *et al.* (2006) zebra balığı embriyolarında alkol (etanol)'ün toksik etkisi ile antioksidan savunma sistemi üzerine etkisine bağlı olarak in vivo Akridin Oranj boyama yöntemi ve TUNEL (TdT-dUTP nick-end-labelling) analizi ile apoptozis artışı tespit etmişlerdir.

Akut metanol maruziyetinin, yetişkin zebra balıklarında beyin dokusunda ectonucleotidase ve asetilkolinesteraz (AChE) aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde 1 saat metanol uygulaması sonucunda test edilen tüm konsantrasyonlarda (%0,25, %0,5 ve %1,0) AChE'nin sırasıyla %39, %33 ve %30,5 oranında önemli bir inhibisyon belirlemişlerdir (Rico *et al.* 2006).

Hamilelik boyunca alkol alımı, fetal alkol sendromu gibi merkezi sinir sistemi gelişimi üzerine olumsuz etkiler oluşturabilir. Yeni doğanlarda ciddi doğuşsal anormallikler gözlenmektedir. Arenzana *et al.* (2006) zebra balıklarının farklı hatlarında (AB, EK, GL ve TL) yapmış oldukları çalışma da farklı etanol konsantrasyonlarında (%2,4, %1,5 ve %1) dört zebra balığı hattındaki embriyolarda gözlerde siklopi tespit etmişlerdir.

Hallare *et al.* (2006) zebra balığı embriyolarında 3 farklı çözücünün (etanol, aseton ve dimetil sülfoksit) embriyotoksitesi üzerine yaptıkları çalışmada embriyoların %1,5 ve %2 etanole maruz bırakıldıklarında yaşama oranının düştüğünü belirlemişlerdir. Etanolün %1,5 konsantrasyonunda embriyolarda ödem, çok zayıf pigmentasyon ve kalp atış hızında azalma gözlemlenirken %2 konsantrasyonunda blastula safhasında toksik

cevap ile karşılaşmışlardır. Gastrulasyon evresinde gecikme, kuyruk anormallikler, eksenel vücut oluşumunda malformasyonlar, beyin ve baş bölgesinde yavaş gelişim, gözlerde siklopi (tek göz) ve mikroftalmi (küçük göz) tespit etmişlerdir.

Rico *et al.* (2006) ergin zebra balıklarına akut alkol (etanol) uygulaması sonucunda beyin dokusunda asetilkolinesteraz enzim aktivitesini (AChE) değerlendirmişlerdir. Zebra balıklarına 1 saat farklı konsantrasyonlardaki etanol (%0,25, %0,5 ve %1) maruziyeti sonucunda %0,25 ve %0,5 dozlarında zebra balığı beyinde AChE aktivitesinin değiştiğini ancak %1 etanol uygulamasında asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin kontrol ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir.

Gelişmekte olan insan embriyonunun etanol ile teması, göz de dahil olmak üzere çoğu organ sistemlerini içeren bir dizi rahatsızlığa neden olur. İnsanlarda rahim içine enjekte edilen etanol maruziyeti sonucu görülen yaygın bir fenotip, mikrofaltmi (küçük göz) dir. Kashyap *et al.* (2007) yapmış oldukları çalışmada bir model organizma olan zebra balığıda retinal nörogenez sırasında etanolün etkilerini tanımlamak ve etanol'ün mikroftalmiye neden olabileceği potansiyel mekanizmaları araştırmışlardır. Zebra balığı embriyolarını döllenmeden sonra 24-48. saatlerde retinal nöroepitelyumun hızlı çoğalmaya uğradığı ve farklı retinal hücre tiplerinden laminat bir yapı oluşturmak için farklılaşmanın olduğu süreçte %1 ve %1,5 etanole maruz bırakmışlardır. Etanol maruziyetinden hemen sonra göz boyutunun önemli ölçüde azalma olduğu ve bu mikroftalmi durumunun larva gelişimi boyunca devam ettiğini tespit etmişlerdir. Bu azalan göz büyüklüğü, embriyonik gelişimdeki genel gecikme ile tam olarak açıklanamaz. Göz merceğindeki hücre ölümü etanol uygulanmış embriyoların bazılarında geniş olsa da retinal hücre ölümü, embriyolarda biraz daha yüksek olduğu bildirmişlerdir.

Alkolden etkilenen yapılar üç germ tabakası, çoğu doku ve organları kapsamaktadır. Ayrıca proteinlerin düzenlenme mekanizması üzerine olan etkilere, fetal alkol sendromu için hedef durumları içine alan embriyonik vaskülarizasyon, kan hücreleri, kalp, göz,

nöral tüp ve beyin gelişindeki anormallikler ve gelişimsel gecikme durumları paralellik gösterdiği bildirilmiştir (Liu *et al.* 2009).

Tert-Butanol, endüstriyel kimyasal sentezinde önemli bir ara maddedir. İnsanların tert-butanol maruziyeti soluma yolu ile gerçekleşebilir. Deri yoluyla az emilir, ancak solunum veya yutulma üzerine hızla emilir ve vücuda dokulara dağıtılır. Ayrıca kandan uzaklaşması çok yavaştır. Oksidasyonla 2-metil-1,2-propandiol vasıtasıyla idrarda baskın metabolit olan 2-hidroksi izobutirata metabolize olur. Konjugasyonlar yüksek dozlarda idrarda bulunabilir. Tert-butanolün tek dozlu sistemik toksisitesi düşüktür. Ancak cildi ve gözleri tahriş eder. Yüksek oral dozlar ataksi (kas koordinasyon bozukluğu) ve hipoaktiviteye (aktivite azalması) neden olur ve tekrarlanan doz maruziyeti bağımlılığı indükleyebilir. Tert-Butanol bir genotoksin olarak tanımlanamaz ve üreme veya gelişime özgü hiçbir etkisi yoktur. Gelişimsel gecikme sadece belirgin maternal toksisite ile ortaya çıkmıştır. Toksisite için hedef organ böbrek olup fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda renal tübül hücrelerde tümör arttırdığı bildirilmiştir (McGregor 2010).

Gelişme sırasında fetal alkol maruziyeti atriyal ve ventriküler septal kusurlar, Fallot teratolojisi (konjenital kalp hastalığı) gibi bir dizi kalp anomalisine neden olur. Bu etanol ile indüklenen anomalilerin arkasındaki mekanizmalar bilinmemektedir. Dlugos and Rabin (2010) yapmış oldukları çalışmada AB hattı olan zebra balığı yumurtaları %0,5 etanole maruz bırakıldıktan sonra 54.saatten 5.güne kadar kalp morfolojisi ve kalp atış hızındaki değişimleri incelemişlerdir. Sonuç olarak zebra larvalarında kronik etanol uygulaması sonucu yaygın olarak perikardiyak ödem, kalp genişlemesi ve büyümesi gözlemlenmiştir. Ayrıca 5.gündeki kalp patolojisi sonuçları da diğer verileri desteklemektedir.

Santos-Ledo *et al.* (2011) çalışmalarında etanol kaynaklı siklopik hayvanlarda görsel bölgelerin farklılaşmasını analiz etmişlerdir. Bu amaçla siklopik embriyolar elde etmek için döllenmeden sonra 4. saatten 24. saate kadar %1,5 etanole zebra balığı embriyolarını maruz bırakmışlardır. Normal ve siklopik zebra balığı embriyolarının

görsel sisteminin (retinanın, optik sinirin ve optik tectumun) ana bileşenleri üzerinde odaklanarak, döllenmeden 2 gün sonra hücre çoğalma hızını ve hücre farklılaşmasını izlemişlerdir. Siklopik larvalarda iki optik sinirin bulunduğu fakat birinin belirgin olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca görsel sistemlerde yapılan incelemede 2.gün hücre farklılaşmasının ciddi ölçüde etanol tarafından geciktirildiğini bildirmişlerdir. Larvalarda 5.günde siklopik retina ve optik tektum tabakası tamamlanmış ancak görsel sistem, hücre ölümünün bir göstergesi olan piknotik çekirdekler ile doludur. Sonuç olarak etanole maruz bırakılarak oluşan değişikliklerin sadece hücre seçici değil doku seçici olduğunda tespit etmişlerdir. Siklopi, etanol ile indüklenen en şiddetli fenotiptir, ancak hücre farklılaşması ve çoğalması belli bir zaman periyodundan sonra normal şekillere erişebilir ve bu da bir nöroplastisite (hasara karşı nörokimyasal ve nörofiziksel uyum geliştirme yetisi) sürecine işaret eder. Zebra balığı embriyoları, etanol etkisine karşı bir denge mekanizmasına sahip olabileceğini, görsel problemleri iyileştirebilecek yeni moleküllerin analizi ve kimyasal taramalar için farmakogenetik alanında kullanımının olabileceği bildirilmiştir.

Alkolün hücrelere bağlanma durumunu incelemek amacıyla NIH 3T3 hücreleri, normal tipli ve mutant L1 CAM ile transfekte edildi ve hücrelere 5 mM n-butanol uygulandı. N-butanol'ün vahşi şuş ile karşılaştırıldığında L1 CAM'a transfer edilmiş mutant NIH 3T3 hücrelerinde azalan hücre adhezyonuna daha az etkisi olduğu bildirilmiştir (Dou *et al.* 2011).

Tang *et al.* (2011) sıçan serebellar granül nöronlara (CGN) 1 saat boyunca n-butanol uygulandıktan sonra L1 lipit yığınları konfokal mikroskopta incelemiş ve n-butanol'ün serebellar (beyincik) granül hücrelerde lipit yığınlarını arttırdığını belirlemişlerdir.

Kardiyak miyositler kompleks sinyallere ve kasılabilen yapılara sahip hücrelerdir. Bu hücreler alkolün toksik etkilerine karşı oldukça duyarlıdır ve alkole bağlı hücre ölümünden sonra yenilenme oranları düşüktür (Krenz and Korthuis 2012).

Sarmah and Marrs (2013) zebra balığı embriyolarında yapmış oldukları çalışmada etanolün kalp yapısında ciddi sorunlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca folik asitin etanol tarafından oluşturulan kalp gelişimi ile ilgili sorunları tedavi edebildiği tespit edilmiştir. Ancak kardiyovasküler sistemde, vücut morfolojisinde ve motor fonksiyonlarındaki değişimlerde etanol maruziyeti sonlandırıldıktan sonraki iyileşme süreci bilinmemektedir. Kalp morfolojisindeki iyileşme sadece en düşük konsantrasyondaki (%1) etanol uygulamasında gözlemlenmiş olup larvaların maruz bırakıldığı daha yüksek konsantrasyonlarda (%2) kalp morfolojisindeki hasarda iyileşmenin olmadığı tespit etmişlerdir.

Son zamanlarda insanlarda 4- (4-hidroksifenil) -2-butanol (HPB) maruziyetinden kaynaklanan deri bozulmaları rapor edilmiştir. Bununla birlikte, HPB'nin neden olduğu bu deri pigmentasyon bozukluklarındaki rolü tam olarak açık değildir. Kuroda *et al.* (2014) yapmış oldukları çalışmada kobaylara yaklaşık 20 gün boyunca günde 3 kez %30 HPB'ye maruz bırakmışlar ve deride depigmentasyon ile karşılaşmışlardır. Bozulmuş deride melanin pigmentinde belirgin bir azalma tespit etmişlerdir. Histopatolojik olarak epidermal melanositlerin sayılarında azalma gözlemlendi. Buna ek olarak, depigmentasyon yavaş yavaş spontan şekilde düzeldi ve ciltteki melanosit sayısı da HPB uygulamasını sonlandırdıktan sonra arttığını belirtildi.

Rhododendrol (4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol) melanin sentezinin bir inhibitörü olan cilt beyazlatıcı kozmetiğidir ve tekrarlanan kullanımı ile depigmentatif bir bozukluk oluşturduğu bildirilmiştir. Bu kimyasalın yüksek konsantrasyonlarında tirozinaz enziminin inhibe olması sonucu insan melanositlerine karşı sitotoksikite gösterdiğini tespit edilmişlerdir. Rhododendrol uygulanmış deride melanositlerde reaktif oksijen türlerinde (ROS) artış gözlenmezken apoptoz ve caspaz-3 enzim aktivasyonundan sorumlu genlerin ekspresyonunda artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Endoplazmik retikulum stresinin tirozinaza bağlı birikiminin ve apoptotik yolağın aktivasyonunun melanosit sitotoksitesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Sasaki *et al.* 2014).

Hepatositler doğal olarak toksinlere maruz kalırlar. Hepatositler, alkolün sitotoksitesini ortadan kaldırmak için alkolü metabolize ederler. Ancak, aşırı alkol (etanol) hepatositlere zarar verir, bu da öncelikle hücre yaşayabilirliğini kaybeder. Lu *et al.* (2015) etanolün hepatosit canlılığını baskıladığını ve bu bulgunun daha önceki bulgular ile uyumlu olduğunu gösterdi.

Matrone *et al.* (2015) zebra balıklarının kalp gelişimini moleküler, fonksiyonel ve yapısal olarak incelemişlerdir. Çalışma 48 ve 120. saatlerdeki zebra balığı larvalarının kardiyak yapısı ve fonksiyonu, kardiyomiyosit proliferasyonu (çoğalması) ve kardiyak spesifik gen ekspresyonunun araştırılması üzerinedir. Zebra balıklarının kalp atış hızı ve kalp yapısındaki değişimin, kardiyomiyosit hücrelerinin sayısının %40 artışına bağlı olarak 48 ve 72. saatlerde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Zebra balıklarında kalbin genişlemesi ise 96 ve 120. saatlerde yavaşladığı bildirilmiştir. Kalp atış hızının 72 ve 96. saatlerde artışına bağlı olarak da kardinal vena kan akışının artışı gözlemlenmiştir. Kalp atış hızı 48. saatte 0,4 nL/dakika iken 120. saatte ise 0,7 nL/dakika olarak tespit edilmiştir. Bu periyottaki kalp atış hızı 120-160 bpm (dakikadaki kalp atım sayısı) şeklinde değişmiş olup 48. saatte 50 nL/dakika ve 120. saatte 110 nL/dakika olarak kaydedilmiştir.

Bailey *et al.* (2015) Zebra balığı embriyoları fertilizasyondan sonra 8-10 ya da 24-27. saatlerde etanole (%0, %1, %3) maruz bırakılmış ve daha sonra 2 ay yetiştirilmeye devam edildikten sonra çeşitli davranış testleri üzerine değerlendirilmiştir. Ayrıca göz çapı ve orta arka beyin sınır morfolojisi de dâhil olmak üzere kranyofasiyal malformasyonlar olarak bilinen dismorfogenez belirtileri de çalışmada tespit edilmiştir. Göz çapındaki anormallikler %1 etanol maruz bırakılan gruplarda (8-10 ve 24-27. saatler) kontrol ile karşılaştırıldığında gözlerde anormallik tespit edilmemişken %3'lük etanol maruz bırakıldığında 8-10. saatlerdeki embriyoların %20,6'sında, 24-27. saatteki grubun %42,4'ünde mikroftalmi (küçük göz) olduğunu bildirmişlerdir.

Alkole bağlı karaciğer hastalıklarının (ALD) patogenezi açık değildir ve etkili bir tedavisi de yoktur. Xing *et al.* (2015) sıçanlara iki hafta boyunca %10 ve %20 alkol ile

muamele etmişlerdir. Karaciğer örnekleri HE (Hematoksilen–Eozin) boyanma sonuçlarında %10 alkol grubu, hepatositlerin şişmesi ve hücre damarlarında bozulma gibi belirgin patolojik değişiklikler tespit etmişlerdir. Ayrıca, %20 alkol ile muamele edilen sıçanlarda karaciğer patolojik değişiklikleri daha belirgindir. HE boyalı karaciğer bölümlerinde hidropik dejenerasyon, bozulmuş hücre kordları (damarları), Mallory cisimcikleri oluşumu ve hücre infiltrasyonu gözlemlemişlerdir. Sonuçlar alkolün sıçanlarda alkole bağlı karaciğer hastalıklarına neden olabileceğini göstermiştir.

Gebelik sırasında annenin alkol tüketimi, fetusta FAS (fetal alkol sendromu) olarak adlandırılan bir dizi gelişimsel bozukluğa neden olabilir. Li *et al.* (2016) zebra balığı embriyolarını %1 ve %2 alkole maruz bıraktıktan sonra kalp ve kan damarlarının morfolojisini, motor fonksiyon değişiklikleri, kardiyovasküler sistemdeki hasar ve iyileşme gibi değişimleri incelemişlerdir. Sonuçlar, alkol maruziyetinin kalp deformasyonunu, daha yavaş kalp atış hızını, tamamlanmamış kan damarlarını ve perikardiyumu (kalp dış zarı) indükleyebileceğini göstermişlerdir. Maruz kalmayı bıraktıktan sonra, %1 alkole maruz kalan larvalarda sadece kalp morfolojisinde iyileşme olurken, %2 alkoldeki larvalarda kardiyovasküler sistemin morfolojisinin ve işlevinin iyileşmediğini tespit etmişlerdir. Alkolün %2 konsantrasyonundaki larvalarda oluşan kardiyak ödem çok belirgin gözlemlenirken daha sonrasında dorsal aortta tahrip, segmental artetlerde koarktasyon (kasılma) ve motor fonksiyonlarında azalma ile geri alınamayan çok ciddi kardiyovasküler kusurlar oluşturmaktadır. Ayrıca %2 alkol grubundaki larvalarda hasar gören kan damarları, patolojide ödemin nedenleri olan geçirgenlikte bir değişikliğe ve kan hacminde bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bale and Lee (2016) dört butanol (n-butanol, sek-butanol, tert-butanol ve izobutanol)'ün potansiyel mekanizmaları dahil gelişimsel nörotoksik etkiler üzerine yayınlanmış literatürü kısaca incelemiş ve değerlendirmişlerdir. Derlemenin amacı mevcut bilgiler ışığında bu kimyasalların insan sağlığı açısından risk oluşturacak noktalarına dikkat çekmek ve bu konu ile ilgili veri boşluklarını ve araştırma ihtiyaçlarını tanımlamaktır. Bu dört butanol'ün maruz kalma potansiyeli, üretim hacmi fazla (1 milyar lb) olan n- ve

tert-butanol için yüksek iken nispeten daha az üretim hacimine (100-500 milyon lb) sahip sek-butanol ve izobutanol de daha düşüktür. Laboratuvar hayvanlarının (kemiricilerin) n- veya tert-butanol maruz bırakıldığı bazı çalışmalarda nörotoksisite ve gelişimsel nörotoksisitenin belirgin işaretleri gözlenmiştir. Butanoller de dahil olmak üzere alkollerin birkaç iyon kanalı ile etkileşime girdiği, akut ve kronik maruziyetlerin ardından bu hedeflerin işlevlerini değiştirdiği bilinmektedir. Buna ek olarak, n- ve sek-butanol'un fetal sıçanlarda beyin astroglial hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca n-butanol in utero olarak maruz bırakılan sıçan yavrularının beyinlerinde dopamin ve serotonin düzeylerinde belirgin artışlar olduğu bildirildi. Ancak tert-butanol sıçanlara gebelik süresinde maruz bırakıldığında serotonin seviyesinde düşüşler olduğu belirlenmiştir. Butanoller için olan mekanik veriler, bazı kemirgen deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda görülen gelişimsel nörotoksisiteyi desteklemektedir. Bununla birlikte, risk analizleri için butanollerin nörogelişimsel ve gelişim üzerine etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde aydınlatmak gerekmektedir. Böylece olası mekanizmanın daha iyi karakterize edileceği düşünülmektedir.

İdiyopatik skolyoz (İS) dünyadaki çocukların %3'ünü etkilemekte olup ancak bu omurilik deformitesinin altında yatan mekanizmalar bilinmemektedir. Grimes *et al.* (2016) zebra balıklarında yapmış oldukları çalışmada omurga morfogenezinde vücut hücrelerindeki hareketli sillerin etkili olduğu tanımlamışlardır. Özellikle, skolyozun başlangıcından sonra sillerin hareketliliğinin omurilik eğrisinin oluşumunun ilerlemesini bloke ettiğini bildirmişlerdir. Skolyoz oluşumunun biyolojik nedeninin vücuttaki serebraspinal sıvı akışını sağlayan siller ile ilişkili olduğu ve bu akışın bozulması ile anormalliğin ortaya çıktığını tespit etmişlerdir.

Skolyoz, en az 10 derecelik lateral spinal eğriliği olan ve popülasyonun %2-4'ünü etkileyen omurga deformasyonunun en yaygın türüdür. Skolyoz, konjenital (doğuştan) skolyoz (CS) ve idiyopatik skolyoz (İS) olarak sınıflandırılır. Bunların arasında, skolyozun en yaygın şekli olan ergenlik idiyopatik skolyoz (AIS), yaygın bir poligenik hastalık olarak bilinir. Skolyozda omurganın şiddetli kıvrılması, derin psikolojik ve sosyal etkilere yol açar. Ancak hem konjenital skolyozun hemde idiyopatik skolyozun

patolojik olarak mekanizması tanımlanmadığı için etyolojiye dayalı tedavileri bulunmamıştır (Guo *et al.* 2016).

Rhododenol veya rhododendrol (RD, 4- (4-hidroksifenil) -2-butanol) birçok bitkide doğal olarak bulunur. RD'nin pigment kaybedici (depigment) özelliği keşfedildi ve parlaklaştırıcı (beyazlatıcı) olarak kozmetik alanında kullanılmaya başlandı. Son zamanlarda bazı tüketicilerin yüz, boyun ve ellerinde lökoderma (deride melanin pigmentinin yerel yetersizliği veya yokluğu), inflamasyon ve deri kızarıklığı olduğu için RD içeren kozmetik ürünleri piyasadan çekildi. Kim *et al.* (2016) B16F10 fare melanom hücreleri ve insan primer epidermal melanositleri üzerine RD toksisitesi ve altında yatan mekanizmayı araştırmışlardır. Rhododenol uygulaması sonrasında hücrelerde doza bağlı olarak canlılığının azaldığı ve hücrelerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Eugene, OR, USA) floresan denemesi ile artışı tespit etmişlerdir. Ayrıca bir antioksidan enzim olan glutatyon peroksidazın aktivitesinde de azalma belirlemişlerdir. ROS oluşumu ile birlikte oksidatif hasarlar ve normal hücrenin çoğalmasında durma görülmüş olup sonuç olarak artan ROS ve bunun sonucunda ortaya çıkan melanositlerin büyümesinin durması Rhododenol'da bağlı lökodermaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Reis *et al.* (2017) enerji içeceklerinin tek başına ve etanolle kombinasyon halinde, sıçanlardaki oksidatif stres ve lipid peroksidasyon durumu üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Karaciğer histopatolojik bulgularında lobüler inflamasyon (iltihaplanma) ve balon dejenerasyonu görülme sıklığını kontrollerle karşılaştırıldığında yüksek oranda olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak beyin histopatolojik bulgularında herhangi bir anormalliğe rastlamadıkları ve bunun nedeninin kısa süreli (14 gün) maruziyet olabileceğini bildirmişlerdir.

Kronik alkol zehirlenmesi artan oksidatif stres ile ilişkilidir. Bununla birlikte, etanolün tetikleme ile artan reaktif oksijen türlerine (ROS) neden olan mekanizmalar ve oksidatif stres gelişiminde mitokondrinin rolü yeterince incelenmiştir. Teplova *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada elde edilen biyokimyasal ve proteomik veriler, ROS

üretimindeki artışın ana nedenlerinden birinin, uzun süreli alkol maruziyetine yanıt olarak glutamatın oksidasyonunun artması olduğunu ortaya koymuşlardır. Glutamat oksidasyonu sırasında, alkole maruz bırakılmış sıçanlardan alınan karaciğer mitokondriyası, kontrol ile karşılaştırıldığında daha fazla süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}^{2-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikalleri ürettiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca proteomik çalışma, kronik alkol maruziyetine maruz kalan sıçanların karaciğer mitokondriyasında yüksek miktarda glutamat dehidrogenaz içeriği olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda mitokondriyal katalaz içeriği kontrol grubuna kıyasla azaldığını da bildirmişlerdi.

Beynin gelişimsel lezyonları prenatal (doğum öncesi) alkol maruziyetinin (PAE) yıkıcı bir sonucudur. Son zamanlarda PAE'nin anjiyojenez ve endotel hücrelerin canlılığı üzerine önemli etkileri olan kortikal vasküler gelişimi etkilediği tespit edilmiştir. Bu etkilerin altında yatan moleküler mekanizmalar halen iyi anlaşılmamıştır. Yapılan çalışma fetal alkol sendromlu (FAS) insan fetüslerinde ve PAE fare modelinde beyin mikrodamarlarındaki otofajik süreç üzerindeki etanol maruziyetinin karakterize edilmesini amaçlamıştır. Sonuçlar PAE'nin insan fetüsü ve yenidoğan fare beyin kortikal mikrodamarlarında otofajik vakuol sayısının arttığına işaret etmektedir (Girault *et al.* 2017).

Alkole bağlı kardiyomiyopati gelişimine neden olan kabul edilen mekanizma, mitokondri metabolizmasının, oksidatif stresin ve apoptozun birbiriyle ilişkili hücresel süreçlerini kapsamaktadır. Mitokondri dokuların sürekli olarak enerji taleplerine karşılayan hayati bir yapı olduğundan bu organelde alkol kaynaklı moleküler değişikliklerin kardiyak fonksiyon bozukluğu ve alkolik kardiyomiyopatiye neden olması şaşırtıcı değildir. Son veriler alkolün, membran potansiyeli ve solunum zinciri aktivitesi (oksidatif fosforilasyon) ile değerlendirilen mitokondrinin işlevini bozduğunu göstermektedir (Steiner and Lang 2017).

Aşırı alkol tüketimi, kardiyak otofaji artışına neden olur ve genellikle kalp hasarını tetikler. Çeşitli kardiyak hastalıklarda otofajinin temel rolü göz önüne alarak, Zhu *et al.* (2017) etanol kaynaklı kardiyak hasar ve bu durumun altında yatan mekanizmada

otofajinin rolünü araştırmışlardır. Etanolün indüklediği otofaji ve kardiyak hasarın, reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışının neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, reaktif oksijen ve azot türlerini temizleyebilen metalotiyonein (MT), MT-TG farelerinde etanol ile uyarılan otofajiyi ve hücre apoptozunu zayıflattığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, bulgular akut etanol maruziyetinin, esasen ROS-JNK-Bcl-2 sinyal yolağı aracılığıyla otofaji ile kalp toksisitesi ve yaralanmaya neden olduğunu düşünmüşlerdir.

Zebra balığı embriyoları farklı dozlarda (%0, %0,25, %0,50, %0,75, %1,50 ve %2) kronik etanole maruz bırakıldığında 48. saatte yüksek dozlarda (%1,50 ve %2) kalp atış hızının azaldığını, 72. saatte de mortalite oranının arttığı tespit etmişlerdir. Ayrıca embriyolarda kontrol grubuna kıyasla vücut boyunun kısaldığını, daha küçük göz çapı ve kalp ödemi belirlemişlerdir. Ayrıca etanol ile muamele edilen embriyolarda Akridin Oranj boyama yöntemi kullanılarak yapılan analizde apoptotik hücrelerin sayısının, kontrol grubuna kıyasla uygulama gruplarında önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir (Ramlan *et al.* 2017).

Müller *et al.* (2017) zebra balıklarında tekrarlanan alkol uygulaması sonrası değişen oksidatif stresi incelemişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada 4-6 aylık yetişkin zebra balıklarına 8 gün boyunca günde 20 dakika %1 (v/v) oranında etanol uygulamışlar ve beyin dokularında SOD (süperoksit dismutaz) ve CAT (katalaz) enzim aktivitesinde azalma, lipid peroksidasyon (MDA) seviyesinde ise artış tespit etmişlerdir. Antioksidan enzimlerdeki bu değişimlere neden olan etanol'ün beyin dokusunda oksidatif zarar yol açabileceğini bildirmişlerdir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Balık materyali

Araştırma, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Zebra balığı araştırma ve toksikoloji deneme ünitesinde yapılmıştır. Bu tez çalışması, Oregon Üniversitesi (ABD) Uluslararası Zebra Balığı Kaynak Merkezi'nden temin edilen AB genotipli zebra balıkları embriyolarında yürütülmüştür. AB genotipi ilk olarak 70'li yıllarda daha güzel görünümlü ve sağlıklı yavrular elde etmek için Oregon Üniversitesi araştırmacıları tarafından ıslah edilmiştir. Sonraları bu hat, özellikle moleküler biyolojide yeni ve teknolojik yöntemlerin gelişmesi ile birlikte toksikoloji çalışmalarında ideal bir model olmuştur. Özellikle toksikoloji çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir model organizma olan AB genotipli zebra balığı (*Danio rerio*) embriyolarının araştırmada kullanılmasının birçok nedeni vardır. Bunlardan en önemlileri, besleme ve büyüme çalışmalarında model organizma olarak kullanılması, özellikle son yirmi yılda omurgalı gelişimi ve insan hastalıklarını modellemede kullanılıyor olmasıdır.

Zebra balığı Cyprinidae familyasını ait bir tür olup, anavatanı Güneydoğu Asya, baskın olarak da Pakistan ve Hindistan'dır. Çalışmamızda kullanılan anaç Zebra balıkları, 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyot uygulanan ve 28,5 °C'lik sabit bir sıcaklığa ayarlanmış Akuatik Habitat (Pentair, USA) içinde muhafaza edilmiştir (Şekil 3.1). Zebra balıklarının yemleme prosedürü günde 2 kez pul yem ve 1 kez canlı yem (*Artemia nauplii*) şeklinde yapılmıştır. Bir zooplankton türü olan ve zebra balıkları için yem olarak kullanılan *Artemia nauplii* ticari olarak temin edilip kapsülünden tuzlu su solüsyonu içinde havalandırma ile 24 saat içinde çıkması sağlanarak zebra balıklarına verilmiştir. Yumurtlamada kullanılacak önceden ayrılmış dişi ve erkek anaçlar ise yumurtlatmadan bir hafta önce günde 2 kez canlı yem ve 1 kez pul yem ile beslenmiştir. Akvaryumların suyunun pH'sı 8, su sertliği de 25 mg/L Ca

olacak şekilde ayarlanmıştır (Hallare *et al.* 2005). Yumurta alınması planlanan uygun vücut formuna sahip anaçlar bir gün önce akşam saatlerinde yumurtlama tanklarına 10 adet 1 dişiye 2 erkek karşılık gelecek şekilde zebra balıkları yerleştirildi. Sabah zebra balığı sistemindeki ışıkların açılması ile çiftleşme başlamış olup yumurtalar hemen akabinde yumurtlama tanklarından alınarak E3 (yumurta solüsyonu) solüsyonuna konulmuştur (EK 1). Döllenmiş ve döllenmemiş yumurtalar mikroskop altında seçilmiştir. Seçilen uygun yumurtalar E3 solüsyonu ile en az üç kez yıkanarak bu solüsyon içinde denemenin yapılacağı zamana kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Zebra balığı kapalı devre sistemi

3.1.2 N-Butanol kimyasalının seçimi ve temini

Yapılan çalışmada 0,810 gr/ml konsantrasyonunda n-butanol kullanılmıştır. Kimyasal Merck Millipore firmasından temin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. N-Butanol (1-butanol, butil alkol, metilol propan) fiziksel ve kimyasal özellikleri (Lee *et al.* 2008)

Kimyasal Formülü	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH
Kimyasal Yapısı	$ \begin{array}{ccccccc} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & & \\ & & & & & & \\ \text{H} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{C} & -\text{O} & -\text{H} \\ & & & & & & \\ & \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} & & \end{array} $
3 Boyutlu Yapısı	
Moleküler Ağırlığı (g/mol)	74,1216
Kaynama Noktası (°C)	116-118
Erime Noktası (°C)	-89,5
Yoğunluk (g/cm ³) (20 °C)	0,81
Patlama Noktası (°C)	34
Kendi Kendine Tutuşma Sıcaklığı (°C)	345

3.2. Yöntemler

3.2.1. Deneme planı ve kimyasalın uygulanması

Deneme planı, dört tekerrürlü olarak semi statik test esasına göre yapılmıştır. Denemede farklı dozlar kullanılmıştır. İlk olarak kontrol, 10, 50, 100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000, 1250, 1500, 2000 ve 2500 mg/L n-butanol embriyolara uygulanarak sınır belirleyici ön test yapılmıştır. Daha sonra bu ön test sonuçları dikkate alınarak ana testte uygulanacak dozlarla deneme yeniden kurulmuştur. Denemede biri kontrol, altısı muamele olmak üzere toplam 7 grup bulunmaktadır. Muamele gruplarına 10, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L konsantrasyonlarında n-butanol uygulanmıştır. Denemenin ilk gününde alınan yumurtalardan rastgele seçilen yumurta içerisinde 50 ml E3 (5 mM

NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, %0,01 metilen mavisi) bulunan 100 ml'lik beherlere alınmıştır. Bütün testler her grup için 4 tekerrür olacak şekilde tasarlanmış olup ölüm oranı (4 tekerrür ile toplam 1280 yumurta), larva çıkış oranı (4 tekerrür ile toplam 1120 yumurta), malformasyon oranı (4 tekerrür ile toplam 1120 yumurta), kalp atış hızı (4 tekerrür ile toplam 960 yumurta), göz ölçümleri (4 tekerrür ile toplam 1120 yumurta), apoptotik hücrelerin belirlenmesi (4 tekerrür ile toplam 960 yumurta), reaktif oksijen radikallerinin belirlenmesi (4 tekerrür ile toplam 960 yumurta) ve histopatoloji (4 tekerrür ile toplam 1120 yumurta) denemelerinde her uygulama grubu için 40 yumurta, asetilkolinesteraz enzim aktivitesi ölçümü için her uygulama grubu için 100 yumurta (4 tekerrür ile toplam 2400 yumurta) ve antioksidan enzimleri ile lipid peroksidasyon düzeyinin belirlenmesinde her grup için 150 yumurta (4 tekerrür ile toplam 3600 yumurta) kullanılmıştır. Yumurta Döllenmeyi takip eden ilk 4 saat süresinde yumurtalar sürekli takip edilmiş ve döllenmemiş yumurtalar uzaklaştırılarak yerine döllenmiş yumurta ilave edilerek denemeye başlanmıştır. Deneme 4. saat sonunda yumurtaların blastula aşamasında alınıp E3 solüsyonu ile hazırlanmış kontrol ve muamele grupları şeklinde steril 100 ml lik cam beher kaplar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her grup için eşit sayıda yumurta içeren beherler 28,5°C sıcaklıktaki su banyosunda konularak deneme süresince yumurtaların optimum sıcaklıkta kalmaları sağlanmıştır (Şekil 3.2). Çalışma için kullanılan kodada 10 saat gündüz 14 saat gece olmak üzere fotoperiyot uygulaması yapılmıştır. Tüm deneme ortamları her gün yenilenmiştir. N-Butanolün uçucu özelliği dikkate alınarak beherlerin üzeri parafin ve petri kabı ile kapatılmıştır (Sulukun *et al.* 2017).



Şekil 3.2. Deneme ünitesi

3.2.2. Embriyonik toksisite ve mortalite belirlenmesi

Deneme başlangıcından itibaren 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde tüm gruplara ait embriyolar Zeiss marka Discovery V12 model stereo mikroskop altında görüntülenmiştir. Bu aşamada embriyoların, vücut morfolojilerindeki anormallikler ve hayatta kalma oranları kaydedilmiştir.

3.2.3. Larvaların yumurtadan çıkabilme oranının belirlenmesi

Yumurtadan larvaların çıkması normal şartlarda 48. saatte başlamaktadır. Koryondan çıkış senkronize gerçekleşmemekle birlikte fertilizasyondan sonraki 72. saate kadar devam etmektedir. Çalışmada n-butanolün larva çıkış oranına etkisi 48. saatten 120. saate kadar gözlemlenmiştir.

3.2.4. CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörünü kullanarak oksidatif stresin belirlenmesi

N-Butanol kimyasalının oluşturacağı oksidatif stres, hücre zarını geçebilen reaktif oksijen türleri indikatörü CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan

diasetat asetil ester)'nın okside formu ile floresan oluşturması sonucu belirlenir. N-Butanol'ün zebra balığı larvalarında reaktif oksijen türlerinde (ROS) meydana getirdiği değişimi in vivo olarak belirlemek için floresan bir reaktif oksijen türleri göstergesi olan CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü kullanılmıştır. Bu gösterge, ROS ile oksitlendiğinde yeşil floresan bir ürün üretir. Reaktif oksijen türlerini belirlemek için 96. saatte her gruptan 10 larva alınarak eppendorf içersinde ultra saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Son yıkamada eppendorf içinde kalan su uzaklaştırılmıştır. Larvalar 1 µg/ml CM-H2DCFDA ile 28,5°C'de etüvde 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası larvalar ultra saf su ile tekrar 3 kez yıkanmıştır. Larvalar %3 metilselüloz ile lama sabitlenmiştir. CM-H2DCFDA indikatörü ile inkübe edilmiş canlı zebra balığı larva örnekleri floresan mikroskop (Zeiss, Discovery V12, Germany) kullanılarak incelenmiştir (Kim *et al.* 2014).

3.2.5. Apoptotik hücrelerin belirlenmesi

Programlanmış hücre ölümünün (apoptozis) canlı embriyolarda belirlenmesinde, elektrostatik çekim ile DNA ve RNA ile etkileşime giren bir metakromatik boya olan Akridin Oranj (AO) kullanılmaktadır. Normal, sağlıklı hücrelere AO boyası geçemezken, plazma membranı hasar görmüş nekrotik veya apoptotik hücrelere geçebilmektedir. Denemenin 96. saatinde her gruptan alınan 10 larva PBS (Phosphate buffered saline) ile 3 kez yıkanır daha sonra 5µg/ml AO boyası ile muamele edilerek 30 dakika karanlık bir ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası embriyolar tekrar 3 kez PBS ile yıkanmıştır ve boyanmış embriyolar floresan mikroskopta (Zeiss, Discovery V12, Germany) incelenmiştir. (Duan *et al.* 2013).

3.2.6. Beyin ve Karaciğer histopatolojisi

Histolojik araştırmalar için 96. saatteki balık larvaları kullanılmıştır. Bu amaçla n-butanol ile temas etmiş ve çeşitli malformasyonlar göstermiş en az 10 larva seçilmiştir. Larvalar bütün olarak %4 paraformaldehit tesbit sıvısında 24 saat bekletilmiştir. Sonra alkolle dehidrate edilen ve ksilol ile temizlenen larvalar parafinle bloklanmıştır. Bu

bloklardan 4–5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hematoksilen-Eosin (Hem-Eo) ile boyanmıştır (Hill *et al.* 2002; Sabaliauskas *et al.* 2006; Li *et al.* 2016). Kesitler kanada balzamu ile kapatıldıktan sonra boyanmış preparatlar ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Beyinde ve karaciğerde meydana gelen anormalliklerin fotoğrafları yine dijital kamera destekli ışık mikroskobu ile çekilmiştir.

Paraformaldehit fiksatifinde 24 saat bekletilen larvalar aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

- 1- Çeşme suyunda 3-4 saat süreyle yıkanmıştır.
- 2- %70'lik alkolde 2 saat bekletilmiştir.
- 3- %80'lik alkolde 2,5-3 saat bekletilmiştir.
- 4- %96'lik alkolde 1 gece, %96, %100, %100'lük alkol serilerinde 1'er saat bekletilmiştir.
- 5- Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III'de 10'ar dakika bekletilmiştir.
- 6- Ksilol: Parafin (1:1) karışımında 10 dakika (56°C'deki etüvde) bekletilmiştir.
- 7- Üç ayrı parafin bünyesinde 1'er saat (56°C'deki etüvde) bekletilmiştir (Hallare *et al.* 2005).

Parafin III banyosundan sonra larvalar parafin kalıplara konulmuş ve bu kalıplardan mikrotom için bloklar hazırlanmıştır. Parafin bloklardan mikrotomla 4-5 mikron kalınlığında larvanın baş kısmından itibaren enine kesitler alınmıştır. Kesitler jelatinli sıcak su banyosuna konularak açılmaları sağlandı ve lamlara alınan kesitler iyice kuruduktan sonra Hem-Eo boya solüsyonundan geçirilmiştir. Kesitlerin genel histolojik yapısını incelemek amacıyla Hematoksilen-Eozin boyaması yapılmıştır (Hallare *et al.* 2005).

Kesitlerin hematoksilen-eozin ile boyanması şu şekildedir:

- 1- Ksilol I'de (20 dak.) bekletilmiştir.
- 2- Ksilol II ve Ksilol III'de (10 dak.) bekletilmiştir.
- 3- %80'lik alkolde (10 dak.) bekletilmiştir.

- 4- İki ayrı %96'lık alkol serisinde (5 dak.) bekletilmiştir.
- 5- Kesitler çeşme suyunda yıkanmıştır.
- 6- Hematoksilen boyasında (1 dak.) bekletilmiştir.
- 7- Asit-alkol karışımına batırılıp çıkarılmıştır.
- 8- Eozin solüsyonunda (1 dak.) bekletilmiştir.
- 9- Suda (1 dak.) yıkanmıştır.
- 10- %80'lik alkolde (10 dak.) bekletilmiştir.
- 11- İki ayrı %96'lık alkol serisinde (10 dak.) bekletilmiştir.
- 12- Ksilol I, Ksilol II ve Ksilol III serilerinde (20 dak.) bekletilmiştir.
- 13- Kanada balzamu ile kapatılmıştır.

Sonuçta hücrelerin çekirdekleri menekşe, sitoplazmaları pembe renge boyanmıştır (Hallare *et al.* 2005; Şişman 2007).

3.2.7. Göz boyutu ölçümü

N-Butanol uygulaması sonrası farklı dozların (kontrol, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) zebra balığı embriyoları ve larvalarının göz yapısına etkisini incelemek için 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki kontrol ve muamele gruplarından gözler, aynı büyütme (x50) ile çekilen dijital fotoğraflarda göz yüzey alanını (piksel olarak) ölçmek için kullanılmıştır. Her gözün hacmi, aynı alana sahip bir dairenin yarıçapına eşit bir yarıçap yarı küresi olarak düşünülmüştür. Her grup için 20 emriyo ve larvanın gözünden alınan ölçümler kontrol ile karşılaştırılmıştır (Bessa *et al.* 2008).

3.2.8. Kalp atış hızı ve kardiyak aktivitenin belirlenmesi

Embriyolarda n-butanolün kardiyak etkilerini belirlemek amacıyla mikroskop altında (Zeiss, Discovery V12, Germany) her grup (kontrol, 10, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) için en az 4 embriyodan 48, 72 ve 96. saatlerde kalp atış hızı, bir zamanlayıcıyı kullanarak canlı video üzerindeki dakika başına ventriküler atım sayısını kaydedilmiştir.

Daniovision programı kullanılarak doza bağı kalp atım sayısı ve 96. saatteki larvalarda kardiyak aktivite belirlenmiştir (Carney *et al.* 2004).

3.2.9. Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin belirlenmesi

Asetilkolinesteraz aktivitesini belirlemek için zebra balığı embriyolarından 96. saatte her uygulama grubundan 100 embriyo Triton-X 100 içeren (%1 v/v) 0,1 M fosfat tamponu (pH 7,4) ile homojenize edildi. Homojenatlar 13,000 rpm'de 30 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edilmiştir ve çöktelti kısmı uzaklaştırılmıştır. Örneklerdeki süpernatant kısımları AChE aktivitesi ölçümü için kullanılmıştır (Rosenfeld *et al.* 2001; Topal *et al.* 2017). Asetilkolinesteraz aktivitesi, modifiye edilmiş Ellman *et al.* (1961) yöntemine göre belirlenmiştir. Enzimatik reaksiyon oluşumu; toplam 1 ml hacim, %1 sodyum sitrat içinde 50 µL de 0.5 mM DTNB, 200 µL 0.5 M fosfat tamponu (KH₂PO₄ / K₂HPO₄, pH 8.0), 650 µL saf su, 50 µL örnek ve 50 µL 10 mM asetilkolinyodür içerir. Kontrol küvetinde (kör) asetilkolinyodür yoktur. Enzim aktivitesi, örneklerde 412 nm dalga boyunda 5. dakikadaki absorbanları şeklinde ölçülmüştür. Bir enzim birimi, 25°C'de dakikada 1 µmol asetiltikolinyodürün hidrolizini katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Protein konsantrasyonu, standart olarak bovin serum albumini kullanılan Bradford yöntemine göre 595 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Bradford 1976).

3.2.10. Antioksidan enzimlerinin aktivitesi ve lipid peroksidasyon (MDA) düzeyinin belirlenmesi

3.2.10.a. Homojenat hazırlanması

Zebra balığı embriyolarında antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyon düzeyi belirlemek için n-butanol uygulama gruplarının herbirinden (kontrol, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) 96. saatte 150 embriyo fosfat tamponu içerisinde homojenize edilmiştir. Aynı deneme dört kez tekrarlanmıştır. Fosfat tamponu hazırlanırken 2,04 gr KH₂PO₄ tartılarak 250 ml saf suda çözündürülmüştür. Üzerine 100 ml saf su eklendikten sonra

pH 7,3'e ayarlanıp son hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır. Tüm vücut örnekleri, 3 katı kadar fosfat tamponu içerisinde homojen hale getirildikten sonra 1300 rpm'de 1 saat santrifüj edilmiştir. Sonra süpernatant kısmı alınarak 4°C'de muhafaza edilerek ölçümler yapılmıştır (Atabeyoğlu 2011).

3.2.10.b. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesinin ölçülmesi

Bu yöntem enzimatik reaksiyon sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin, ortamda bulunan nitro blue tetrazolium (NBT)'u indirgemesi esnasında, numunede bulunan süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) enziminin serbest radikalleri engellenmesi prensibine dayanır. Ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile süperoksit radikalleri meydana gelir. Üretilen süperoksit radikalleri NBT ile reaksiyona girerek formazan (mor) boya üretir. Reaksiyon sonucu görülen renk değişimi spektrofotometre ile 560 nm'de ölçülür. Reaksiyon sırasında SOD açığa çıkan radikalleri dismutasyona uğratar ve böylece NBT redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer.

	Numune	Kör
Fosfat Tamponu (µl)	310	310
NBT (µl)	300	300
Na ₂ CO ₃ (µl)	200	200
Sığır Albumin (µl)	100	100
Ksantin (µl)	40	40
Homojenat (µl)	30	-
Distile Su (µl)	-	30
Ksantin Oksidaz (µl)	20	20

Ependorf tüpler içerisinde kör ve numune hazırlanarak oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Sonrasında reaksiyonu durdurmak için 500 µl CuCl₂ eklenmiş ve absorbans ölçülerek spesifik aktivite (EU/mg protein) hesaplamaları yapılmıştır (Sun *et al.* 1988).

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{(\text{Körün absorbansı} - \text{Numunenin absorbansı})}{(\text{Körün absorbansı})}$$

Bir SOD ünitesi, NBT redüksiyonunu %50 oranında inhibe eden aktivite olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla; Aktivite (EU/ml) = %İnhibisyon / 50 x 0,1'dir. Spesifik Aktivite = (EU/ml) / (mg protein/ml) eşitliğinden hesaplanmıştır.

3.2.10.c. Katalaz (CAT) aktivitesinin ölçülmesi

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Aebi (1974) metodu kullanılmıştır. Hidrojen peroksitin (H_2O_2) katalaz enzimi tarafından yıkılması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyon, spektrofotometrede 240 nm'de ölçüm yapılarak tespit edilmektedir. Absorbans miktarında meydana gelen azalma hızı katalaz aktivitesi ile ilişkilendirmektedir.

3.2.10.d. Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin ölçülmesi

Hidrojen peroksit tarafından indirgenmiş glutatyon (GSH), GPx aracılığı ile okside glutatyona (GSSG) yükseltgenir. Sonrasında ters yönde GSSG'nin glutatyon redüktaz enzimi ile tekrar GSH'a indirgenmesi esnasında ortamda bulunan NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kullanılır. GPx aktivitesi, NADPH'in $NADP^{+}$ 'ye yükseltgenmesi sırasındaki absorbansdaki azalış farkının 340 nm'de ölçülmesiyle hesaplanır (Beutler 1984).

Numuneler aşağıdaki gibi hazırlanarak 37°C'de 10 dakika bekletildikten sonra üzerine 10µl t-bütil eklenerek spektrofotometrede 340 nm'de 2 dk (0; 60; 90; 120 sn) okuma yapılmıştır.

	Numune (µl)	Kör (µl)
Tris-EDTA	100	100
GSH	20	20
GR	100	100
NADPH	100	100
Hemolizat	10	-
Saf Su	660	670

Hesaplama

$$\text{GPx Aktivitesi (U/mL)} = \Delta\text{OD} / t \times V_t / (6,22 \times V_o)$$

ΔOD = Zamana göre absorbans değişimi

t = Zaman

V_t = Toplam hacim

V_o = Örnek hacmi

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \text{GPx aktivitesi} / \text{Protein miktarı}$$

3.2.10.e. Lipid peroksidasyonun (MDA) düzeyinin ölçülmesi

Lipit peroksidasyon seviyesi, çoklu doymamış yağ asitlerinin parçalanmasından nispeten sabit bir oranda oluşan lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesi ile tespit edilir. Dolayısıyla, MDA miktarının özellikle in vitro olarak belirlenmesi lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesidir (Aust, 1994). MDA, aerobik şartlarda pH 3,4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyon sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur ve spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülür (Gutteridge 1995; Reilly and Aust 2001).

Çözeltiler

1-EDTA çözeltisi (0,1 M): 37,224 gr EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür.

2-BHT çözeltisi (%88): 0,220 gr BHT 25 ml saf alkolde çözölmüştür.

3-NaOH çözeltisi (0.05 N): 2 gr NaOH 1 lt distile su içerisinde çözöndürölmüştür.

4-TBA çözeltisi (%1): 1 gr TBA 100 ml'ye 0,05 N NaOH ile tamamlanmıştır.

5- TCA (%30) : 30 gr TCA 100 ml distile su içerisinde çözöndürölmüştür.

6- Fosfat Tamponu: 8,1 gr NaCl, 2,302 gr Na_2HPO_4 , 0.194 gr NaH_2PO_4 distile suda eritilerek 1 lt'ye tamamlandıktan sonra pH'sı 7,4'ye ayarlanmıştır.

Deneyin yapılışı

200 μl hemolizat üzerine 800 μl fosfat tamponu -25 μl BHT çözeltisi ve 500 μl %30'luk TCA eklenmiştir. Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra 20°C'de 2 saat süresince bekletilmiştir. Sonra 15 dk 2000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant kısmından 1 ml alınarak başka tüplere aktarılmıştır. Yeni tüpler üzerine 75 μl EDTA ve 250 μl TBA eklenmiştir. Tüpler vortekste karıştırılıp ve 15 dk sıcak su banyosunda (90°C'de) bekletilmiştir. Sonrasında oda sıcaklığında 532 nm'de UV/Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır.

Hesaplanması $A=a.b.c$ A=absorbans, a=ekstinksiyon katsayısı, b=ışık yolu, c=konsantrasyon (Abs.532) =MDA nmol/ml.

3.2.10.f. Protein miktarı ölçölmesi

Enzim çözeltilerinin kantitatif protein miktarının ölçölmesinde Bradford (1976) yöntemi kullanılmaktadır. Yöntemde kullanılan Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteine bağlanmasını içeren bir protein belirleme yöntemidir. Bu boya kırmızı ($\lambda_{\text{max}}=465 \text{ nm}$) ve mavi ($\lambda_{\text{max}}=595 \text{ nm}$) formu olan, negatif yüklü olduğu için pozitif yüke sahip proteine bağlanan bir maddedir. Boyanın proteine bağlanması, kırmızı

formun mavi forma dönüşmesini sağlar. Bradford yönteminde, sığır serum albümini (BSA) kullanılarak elde edilen standart grafik yardımıyla her bir numunedeki protein miktarı BSA'ya eşdeğer olarak bulunur.

3.2.11. HUVEC (İnsan umbilikal damar / vasküler endotelyum hücreleri) Hücre kültürü denemesi

3.2.11.a. Hücre kültürü medyumunun hazırlanması

Hücre kültürü medyumunu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) Thermo Fisher Scientific firmasından satın alınmıştır. Medium içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ve %1 penisilin ve strapromisin antibiyotikleri eklenerek bir karışım hazırlanmıştır (Sakkas *et al.* 1994).

3.2.11.b. FBS (Fetal bovine serum) hazırlanması

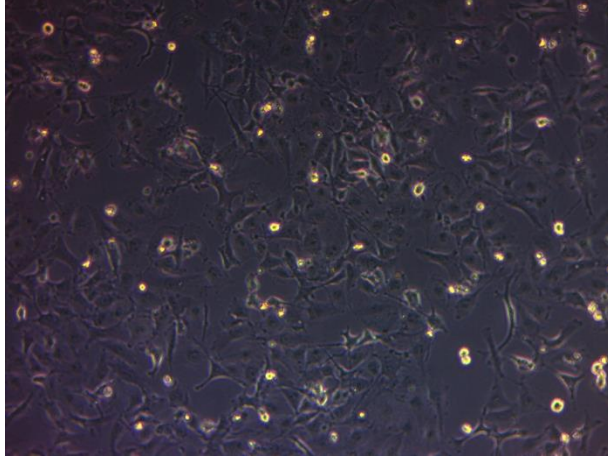
FBS (Fetal Bovine Serum) Thermo Fisher Scientific firmadan temin edildi ve -20°C 'de saklanmıştır.

3.2.11.c. PBS Tampon çözeltisinin hazırlanması

Tablet şeklinde temin edilen PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline), her tablet 100 ml ddH₂O (sterile ultra-pure water) ile hazırlanmış ve otoklavda steril edilip $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

3.2.11.d. Çalışmada kullanılan hücre soyu

Çalışmada insan HUVEC (İnsan umbilikal damar/vasküler endotelyum hücreleri) hücre hattı kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. HUVEC (İnsan umbilikal damar/vasküler endotelyum hücreleri) hücrelerinin invert mikroskop görüntüsü.

3.2.11.e. Hücre soyunun başlatılması

Sıvı azot içinde saklanan hücre hatlarının büyütülmesi için sıvı azot tankından çıkarıldıktan sonra 37°C sıcaklığındaki su banyosuna alınmış ve hızlıca çözünmeleri sağlanmıştır. Çözünen hücreler %10'luk FBS içeren medyuma alınmış, alt üst edilmiştir ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, oluşan pellet medyum ile çözülmüş ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenmiş ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur (Yaoxian *et al.* 2013).

3.2.11.f. Hücrelerin büyütülmesi

Hücreler 5 ml medyum içinde 25 cm² flasklarda, içerisinde, %1 PSA (penisilin, streptomisin, amfoterisin) ve %10 FBS içeren DMEM medyumunda içerisinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak büyütülmüştür.

3.2.11.g. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler %80-90 oranında bulundukları yüzeyi kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25cm² flasklar için 1 ml

Trypsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklendi ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış, pellet medyum ile çözülmüş ve flasklara ekim yapılmıştır. Flasklar etiketlenmiş ve 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatöre konulmuştur (Freshney 2000; Davis 2002).

3.2.11.h. Hücrelerin sıvı azotta saklanması

Hücreler bulundukları yüzeyi %80-90 oranında kaplayınca, içerisindeki medyum uzaklaştırılmıştır. Hücreler 2 kez steril PBS ile yıkandı ve 25 cm² flasklar için 1 ml Trypsin-EDTA ile tripsinizasyon yapılmıştır. Hücreler yüzeyden ayrılınca medyum eklenmiş ve 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılmış, pellet %10 DMSO içeren FBS ile dikkatlice çözülmüş ve sıvı azota dayanıklı cryovial tüplerine konularak, etiketlenmiş ve izole edilerek, öncelikle -80°C derin dondurucuya konulmuş, dereceli olarak sıcaklığın düşmesi sağlandıktan sonra sıvı azot içinde uzun dönemli saklanmıştır (Freshney 2000; Davis 2002).

3.2.11.i. N-Butanol'ün HUVEC hücre kültürüne uygulanması

25'lik flasklarda büyütülen hücreler n-butanol uygulaması için 6'lık platlere ekilmiştir. Bir gün boyunca 37°C, %5 CO₂ içeren inkübatörde büyümeleri sağlanmıştır. İnvert mikroskop altında hücre yoğunluğu kontrol edilmiştir. İstenen yoğunluğa ulaşan hücrelere n-butanolün farklı dozları (0, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) uygulanmıştır. Uygulamadan 60 dakika sonra ve 48.saatte hücre kültürleri üzerine n-butanol'ün etkisi invert mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.2.12. İstatistik analiz

N-Butanol bileşiği için LC_{50} değeri probit analizi hesaplanmasında Microsoft Excel programı kullanılmıştır (Finney and Stevens 1948). Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $P < 0,05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ölüm oranı, larva çıkış oranı ve malformasyon oranı verileri için istatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows, version 20.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün veriler istatistiksel sonuç, standart hata ve ortalama değerleri ile verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık a one-way (ANOVA) varyans analizi ile belirlendikten sonra LSD test ile değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

Histopatolojik veriler için istatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows, version 20.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bütün veriler istatistiksel sonuç, standart hata ve ortalama değerleri ile verilmiştir. 7 grup arasındaki gözlenen farklılıklar nonparametrik test (Kruskal-Wallis) ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U-test ile değerlendirilmiştir ($p < 0,05$).

Göz boyutu ve kalp atış hızı analizleri DanioVision programı ile sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış veriler için istatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows, version 20.0) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık a one-way (ANOVA) ve Two-way ANOVA varyans analizleri ile belirlendikten sonra LSD ve Duncan testleri ile değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

Enzim analiz verileri için istatistiksel analizler SPSS programı (SPSS for Windows, version 20.0) kullanılarak gerçekleştirildi. Bütün veriler istatistiksel sonuç, standart hata ve ortalama değerleri ile verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılık a one-way (ANOVA) varyans analizi ile belirlendikten sonra Duncan's testi ile değerlendirilmiştir ($P < 0,05$).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. LC₅₀ değeri

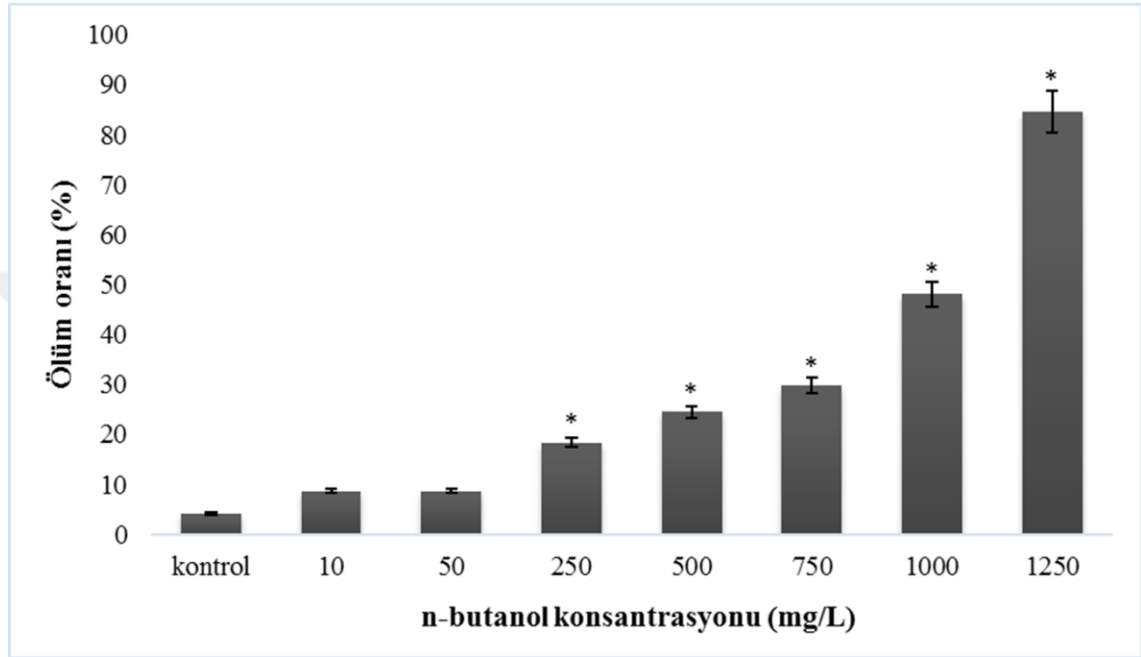
Zebra balığı embriyo ve larvalarına farklı dozlarda n-butanol uygulandıktan sonra 96. saatteki LC₅₀ değeri belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) embriyoların ilk saatler içinde normal embriyonik gelişimlerini devam ettiremedikleri ve öldükleri görülmüştür. Embriyolarda en düşük dozlarda (10 ve 50 mg/L) dahi toksik etkiler tespit edilmiş olup en belirgin etkilerin ise 500 mg/L den sonra olduğu gözlemlenmiştir.

LC₅₀ değerinin tespit edilmesi amacıyla döllenmiş balık yumurtalarına fertilizasyondan itibaren n-butanol maruziyeti gerçekleştirilmiş ve 96 saat sonra canlı kalan ve ölen embriyolar tespit edilerek probit analizi ile ortalama değerler elde edilmiştir. N-Butanolün zebra balığı embriyoları için belirlenen LC₅₀ değeri 96. saatte 1170,589 mg/L olarak bulunmuştur. Bu kimyasalın zebra balığı embriyolarındaki LC₅₀ değeri ilk olarak bu araştırmada tespit edilerek literatüre kazandırılmıştır.

4.2. Yumurta ve Embriyo Mortalitesi

N-Butanolün yumurta ve embriyoda ölümlere sebep olup olmadığı sınır belirleyici test sonuçlarından anlaşılmış ve belirlenen dozlar neticesinde uygulamalar dört kez tekrarlanarak ölüm oranları bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada hayatta kalma oranı doza ve zamana bağlı olarak azalmıştır (Şekil.4.1). Özellikle yüksek dozlarda (250, 500, 750, 1000 ve 1250 mg/L) hayatta kalma oranı kontrol ile karşılaştırıldığında önemli oranda ($p < 0,05$) düşerken en yüksek dozda (1250 mg/L) ölüm oranı 96. saatte %84 olarak belirlenmiştir. Ayrıca ölüm oranının 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonlarda canlı oranı daha yüksek ancak bunların çoğunda da subletal malformasyonlar gözlenmiştir. Anormal görünümlü larvalar ise n-butanol içeren ortamdan uzaklaştırılıp normal bir çözelti içinde

alındığında ise en fazla 9 gün yaşamışlardır. Ancak perikardiyak ödemli larvaların en fazla 4 gün yaşadığı ve omurga anormalliğine sahip larvaların ise 6 gün hayatta kalabildiği belirlenmiştir.



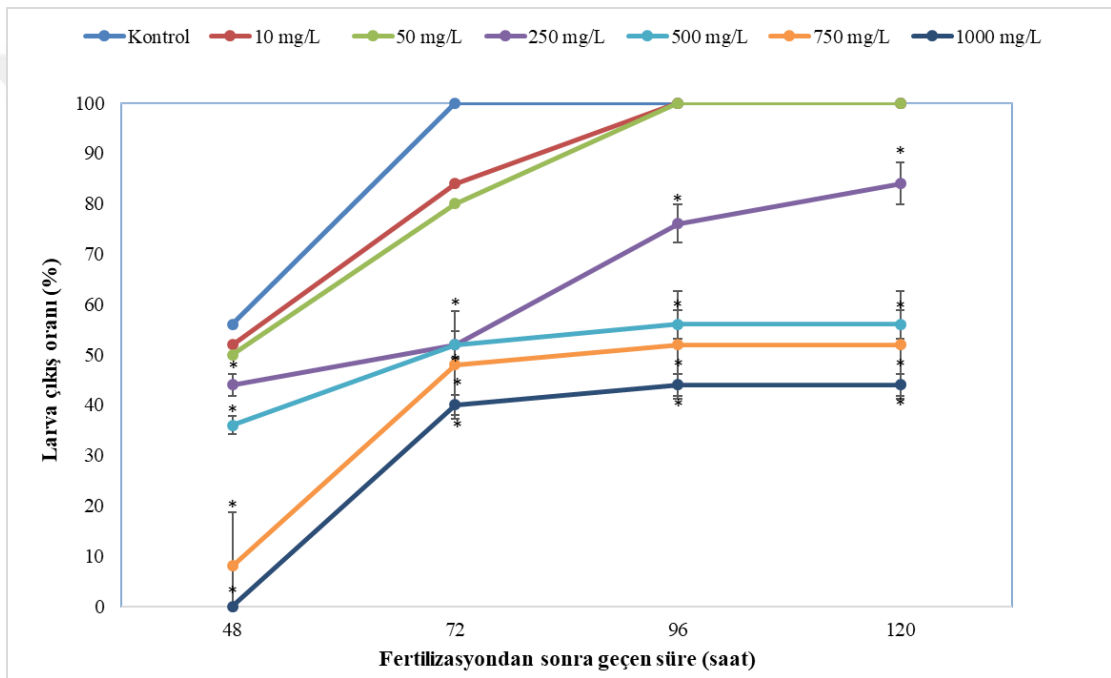
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda n-butanol bileşiğine 96 saat süreyle maruz kalmış zebra balığı embriyo ve larvalarındaki ölüm oranı

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış olup deneme 4 tekrar olarak yapılmıştır. (* $p < 0.05$: kontrol ile diğer grupların karşılaştırılması, ANOVA, LSD test). (n =4, her grup için 40 yumurta).

4.3. Larvaların Yumurtadan Çıkabilme Başarısı

Larvaların yumurtadan çıkışı normal şartlarda (28,5°C, pH 7, E3 solüsyonu içinde) 48. saatte başlamaktadır. Koryondan çıkış eş zamanlı gerçekleşmemekle beraber fertilizasyondan sonraki 72. saate kadar fotoperiyot ve sıcaklığa bağlı olarak devam etmektedir. Kontrol grubundaki embriyoların neredeyse tamamı 48. saatte koryondan çıkarken deneme grubu (10, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) embriyolarında koryondan çıkış gecikmiş, embriyoların bir kısmı koryondan çıkamamış ve canlılıklarını kaybetmişlerdir. Özellikle 1250 mg/L n-butanol uygulanan embriyoların tamamı koryondan çıkamazken 1000 mg/L olan uygulama grubundaki larvaların %56'sı koryondan çıkamamıştır. Larvaların koryondan çıkabilme yüzdeleri ve saatleri Şekil

4.2’de gösterilmiştir. Larva çıkış oranları kontrol ve uygulama grupları arasında karşılaştırıldığında LSD testine göre 48. saatte yüksek dozlar (250, 500, 750 ve 1000 mg/L) istatistiki olarak kontrol ile anlamlı farklılık gösterirken 10 ve 50 mg/L uygulama dozları istatistiki olarak kontrol ile anlamlı farklılık göstermemektedir. ($p<0,05$). Ayrıca 96 ve 120. saatteki larva çıkış oranları, kontrol ile yüksek uygulama grupları (250, 500, 750 ve 1000 mg/L) karşılaştırıldığında istatistiki açıdan anlamlı farklılığın olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. N-butanol uygulanmış döllenmiş zebra balığı embriolarının koryondan çıkabilme oranı

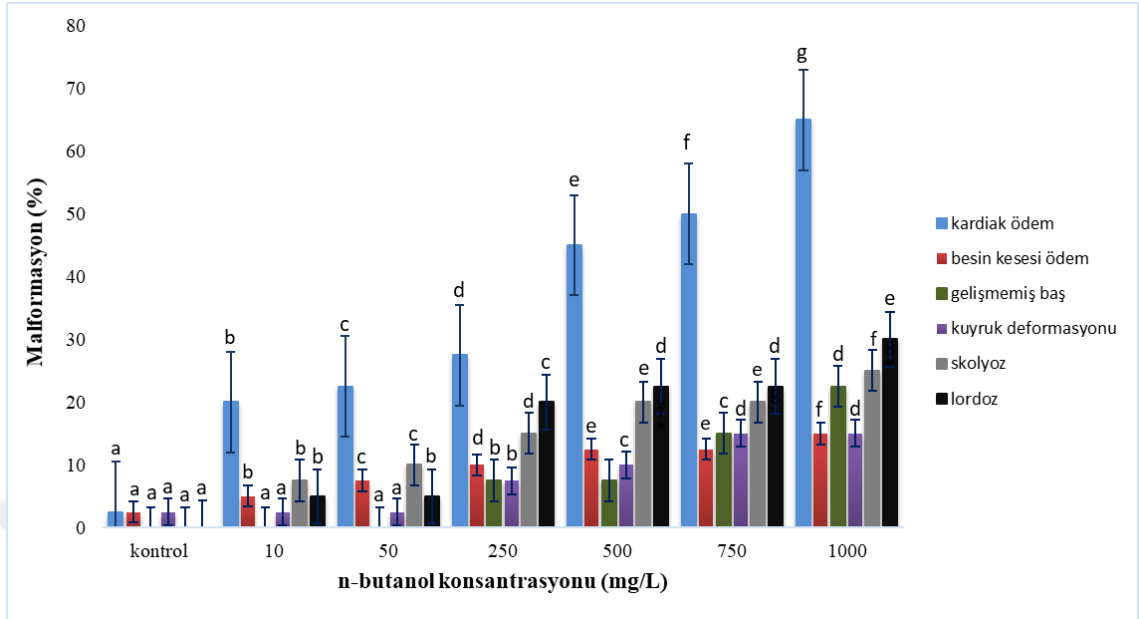
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış olup deneme 4 tekrar olarak yapılmıştır. (* $p<0.05$: kontrol ile diğer grupların karşılaştırılması, ANOVA, LSD test). (n=4, her grup için 40 yumurta)

4.4. Malformasyon Oranı ve Teratojenik Etkiler

N-butanol uygulama sonrası morfolojik anormallikler kontrol ile uygulama grupları (10, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) karşılaştırıldığında anlamlı ($P<0,05$) farklılık göstermekte olup en fazla gözlemlenen anormallik %65 oranı ile kardiyak ödem olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 4.1) Fakat 500 ve 750 mg/L doz uygulanan gruplar arasında besin kesesi ödemi, skolyoz ve lordoz oluşumu bakımından fark görülmeyp, LSD testine göre anlamlı bir fark belirlenmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca 10, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L doz uygulanan gruplarında tüm malformasyon oluşumlarının belli bir düzeyde arttığı görülmüştür (Şekil.4.3).

Çizelge 4.1. Zebra balığı embriyo ve larvalarında farklı dozlardaki n-butanol'ün oluşturduğu malformasyon oranları

	kardiyak ödem (%)	besin kesesi ödem (%)	gelişmemiş baş (%)	kuyruk deformasyonu (%)	skolyoz (%)	lordoz (%)
Kontrol	2,5	2,5	0	2,5	0	0
10 mg/L	20	5	0	2,5	7,5	5
50 mg/L	22,5	7,5	0	2,5	10	5
250 mg/L	27,5	10	7,5	7,5	15	20
500 mg/L	45	12,5	7,5	10	20	22,5
750 mg/L	50	12,5	15	15	20	22,5
1000 mg/L	65	15	22,5	15	25	30



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda n-butanol bileşiğine 96 saat süreyle maruz kalmış zebra balığı embriyo ve larvalarındaki malformasyonların oranı

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış olup deneme 4 tekrar olarak yapılmıştır. (n =4, her grup için 40 yumurta). Farklı harfler, dozlara bağlı malformasyon oranları arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir (p <0,05)

Kontrol grubu embriyo ve larvalarının 24 (Şekil 4.4), 48 (Şekil 4.11), 72 (Şekil 4.18) ve 96. saatteki (Şekil 4.25) gelişimleri normal olarak değerlendirilmiştir. Öte yandan 24. saatteki n-butanol uygulanmış embriyoların 10 mg/L dozunda; besin kesesi ödemi (Şekil 4.5a), kardiyak ödem (Şekil 4.5b), 24. saatteki 50 mg/L dozunda; gelişmemiş baş (Şekil 4.6a), küçük göz (mikroftalmi) (Şekil 4.6b) ve lordoz (Şekil 4.6c), 24. saatteki 250 mg/L dozunda; kardiyak ödem (Şekil 4.7a), küçük baş oluşumu (Şekil 4.7b), gelişmemiş baş (Şekil 4.7c), somit oluşumu tamamlanmamış (Şekil 4.7d), küçük göz oluşumu (Şekil 4.7e) ve besin kesesi ödemi (Şekil 4.7f), 24. saatteki 500mg/L dozunda; Besin kesesi ödemi ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.8b) ve lordoz (Şekil 4.8c), 24. saatteki 750 mg/L dozunda; gelişmemiş baş (Şekil 4.9a,b), besin kesesi ödemi ve kardiyak ödem (Şekil 4.9c), 24. saatteki 1000 mg/L dozunda; kardiyak ödem (şekil 4.10a), gelişmemiş baş ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.10b), besin kesesi ödemi ve somit oluşumu tamamlanmamış (Şekil 4.10c), baş gelişmemiş (Şekil 4.10d) ve küçük göz oluşumu (Şekil 4.10e) belirlenmiştir.

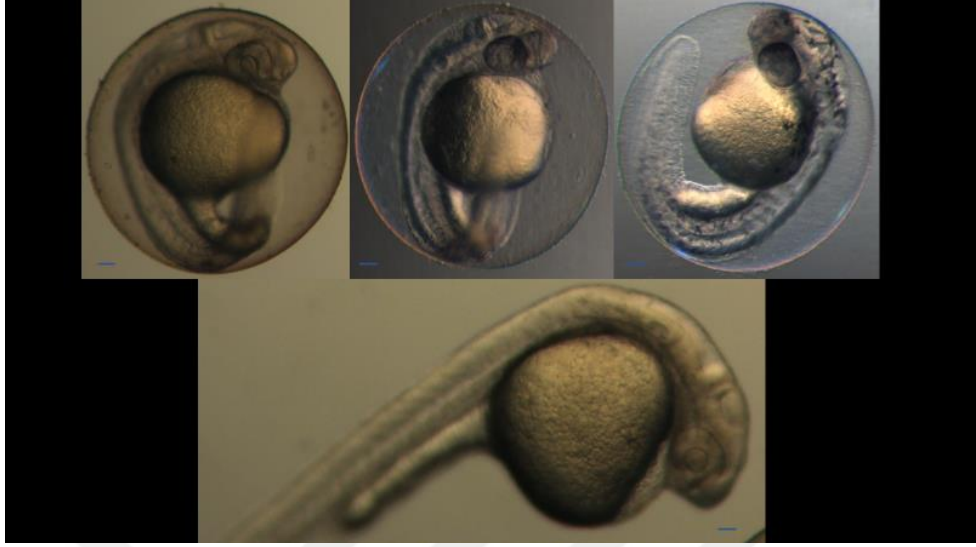
Zebra balığı larvalarında 48. saatteki 10 mg/L dozunda; kardiyak ödem (Şekil 4.12a,b,c), 48. saatteki 50 mg/L dozunda; kardiyak ödem (Şekil 4.13a), gelişmemiş baş (Şekil 4.13b), siklopi (tek göz), lordoz ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.13c), 48. Saatteki 250 mg/L dozunda; kardiyak ödem ve besin kesesi ödemi (Şekil 4.14a), kuyruk anormalliği (Şekil 4.14b), gelişmemiş baş (Şekil 4.14d), 48. saatteki 500 mg/L dozunda; gelişmemiş baş ve kardiyak ödem (Şekil 4.15a), kuyruk anormalliği ve skolyoz (Şekil 4.15b), lordoz (Şekil 4.15c) ve kan birikimi (Şekil 4.15d), 48. saatteki 750 mg/L dozunda; kardiyak ödem ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.16a), lordoz (Şekil 4.16b), küçük göz oluşumu ve gelişmemiş baş (Şekil 4.16c), 48. saatteki 1000 mg/L dozunda; kardiyak ödem ve kan birikimi (Şekil 4.17a), lordoz (Şekil 4.17b), gelişmemiş baş (Şekil 4.17c) ve skolyoz (Şekil 4.17d) gözlemlenmiştir.

Zebra balığı larvalarının 72. saatteki 10 mg/L dozunda; kardiyak ödem, skolyoz ve zayıf pigmentasyon (Şekil 4.19a), tüm vücut ödemi (anazarka) (Şekil 4.19c), 72. saatteki 50 mg/L dozunda; skolyoz (Şekil 4.20a), kardiyak ödem, kuyruk anormalliği ve lordoz (Şekil 4.20b), tüm vücut ödemi (anazarka) (Şekil 4.20c), zayıf pigmentasyon (Şekil 4.20d), 72. saatteki 250 mg/L dozunda; kuyruk anormalliği ve kısa boy (Şekil 4.21a), lordoz ve zayıf pigmentasyon (Şekil 4.21b), kardiyak ödem (Şekil 4.21c), tüm vücut ödemi (Şekil 4.21d), 72. saatteki 500 mg/L dozunda; kardiyak ödem (Şekil 4.22a), kuyruk anormalliği (Şekil 4.22b), lordoz (Şekil 4.22c), skolyoz (Şekil 4.22d), 72. saatteki 750 mg/L dozunda; zayıf pigmentasyon (Şekil 4.23a), gelişmemiş baş ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.23b), kardiyak ödem (Şekil 4.23c), lordoz ve tüm vücut ödemi (Şekil 4.23d) ve skolyoz (Şekil 4.23e), 72. saatteki 1000 mg/L dozunda; skolyoz (Şekil 4.24a), tüm vücut ödemi (Şekil 4.24b), lordoz (Şekil 4.24c), kardiyak ödem ve zayıf pigmentasyon (Şekil 4.24d),

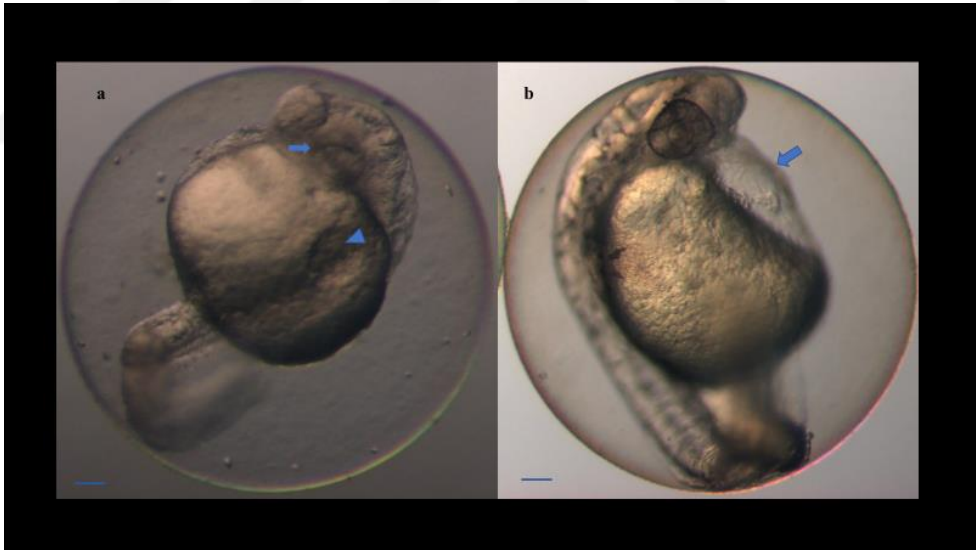
Zebra balığı larvalarında 96. saatteki 10 mg/L dozunda; kuyruk anormalliği, kardiyak ödem ve gelişmemiş baş (Şekil 4.26a), tüm vücut ödemi, küçük göz ve baş oluşumu (Şekil 4.26b), 96. saatteki 50 mg/L dozunda; zayıf pigmentasyon ve lordoz (Şekil 4.27a), kardiyak ödem ve besin kesesi ödemi (Şekil 4.27b), kuyruk anormalliği (Şekil 4.27c), tüm vücut ödemi (Şekil 4.27d), 96. saatteki 250 mg/L dozunda; kardiyak ödem ve kan toplanması (Şekil 4.28a), skolyoz ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.28b), tüm vücut

ödemi, küçük göz ve baş oluşumu (Şekil 4.28c), 96. saatteki 500 mg/L dozunda; siklopi ve lordoz (Şekil 4.29a), tüm vücut ödemi, küçük baş ve göz oluşumu (Şekil 4.29b), zayıf pigmentasyon ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.29c), skolyoz ve gelişim anormalliği (Şekil 4.29d), 96. saatteki 750 mg/L dozunda; skolyoz (Şekil 4.30a), kuyruk anormalliği (Şekil 4.20b), zayıf pigmentasyon ve lordoz (Şekil 4.30c), kardiyak ödem (Şekil 4.30d), besin kesesi ödemi ve lordoz (Şekil 4.30e), 96. saatteki 1000 mg/L dozunda; lordoz ve zayıf pigmentasyon (Şekil 4.31a), kardiyak ödem ve kuyruk anormalliği (Şekil 4.31b), küçük göz, küçük baş oluşumu ve tüm vücut ödemi (Şekil 4.31c) gözlemlenmiştir.

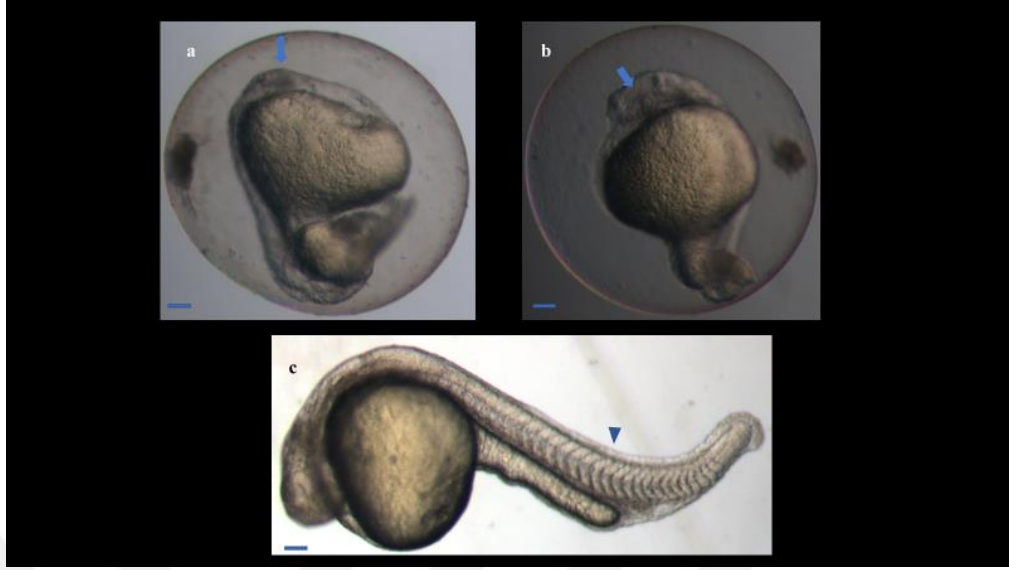




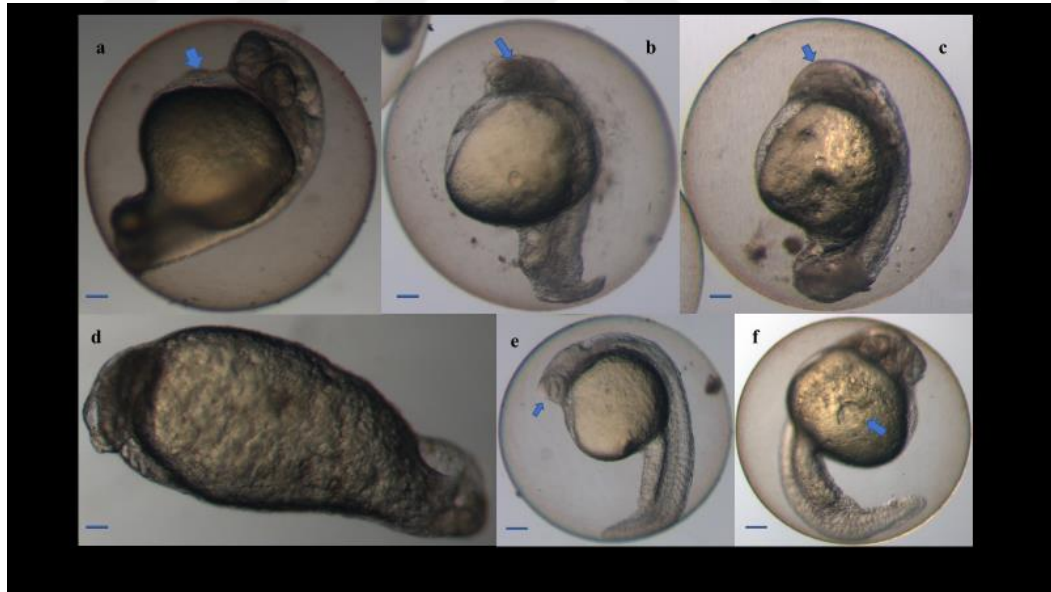
Şekil 4.4. Kontrol grubu 24. saatteki zebra balığı embriyosu. Skala:200µm



Şekil 4.5. Zebra balığı embriyolarına 10 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a) besin kesesi ödemi (ok başı) ve küçük göz (ok), b) kardiak ödem (ok). Skala:200µm.



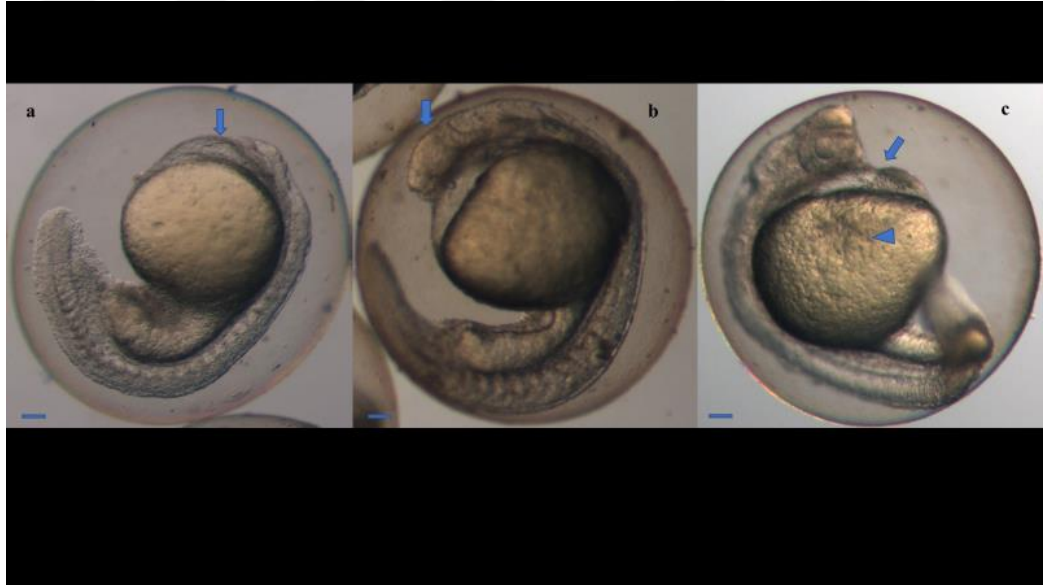
Şekil 4.6. Zebra balığı embriyolarına 50 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a) baş gelişmemiş, b) küçük göz, c) lordoz (ok başı). Skala:200μm.



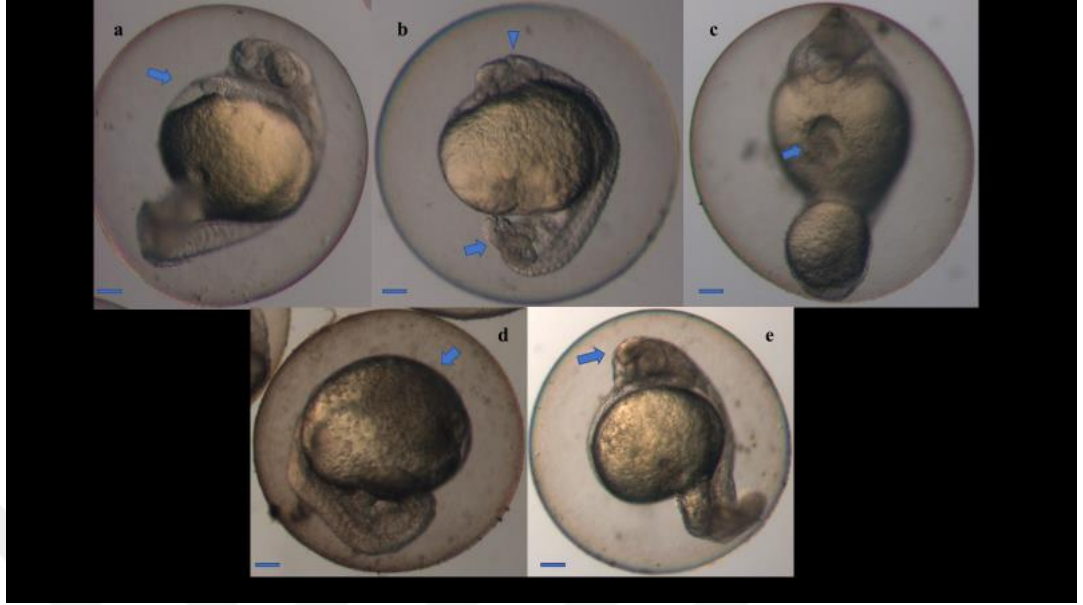
Şekil 4.7. Zebra balığı embriyolarına 250 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem, b) küçük baş, c) gelişmemiş baş, d) somit oluşumu yok ve gelişim tamamlanmamış, e) küçük göz oluşumu, f) besin kesesi ödemi. Skala:200μm



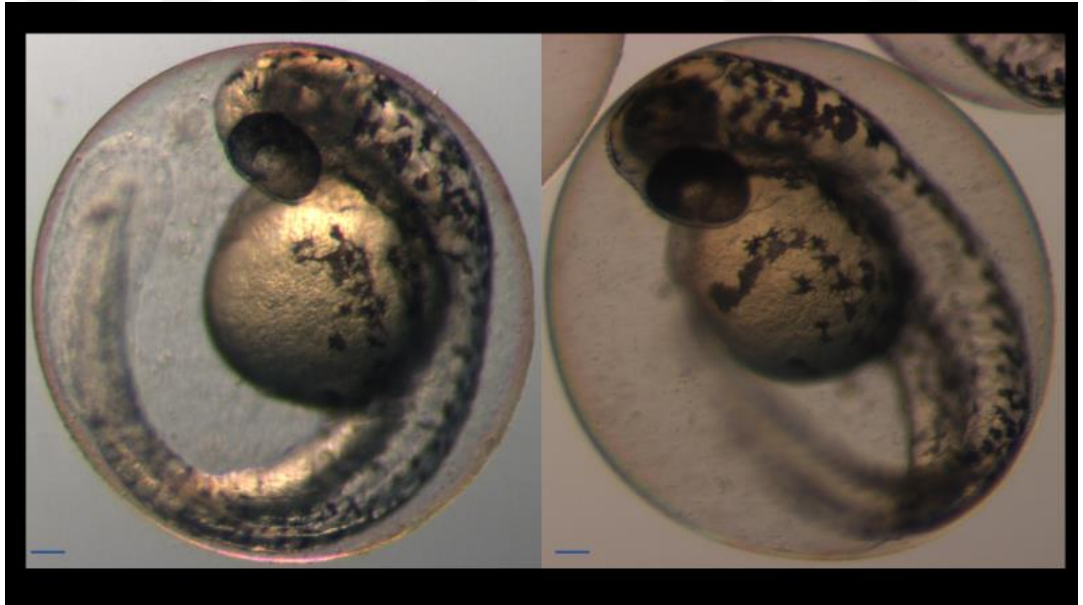
Şekil 4.8. Zebra balığı embriyolarına 500 mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a) besin kesesi ödemi (ok başı), gelişmemiş baş (ok), b) besin kesesi ödemi ve kuyruk anormalliği, c)
lordoz. Skala:200µm



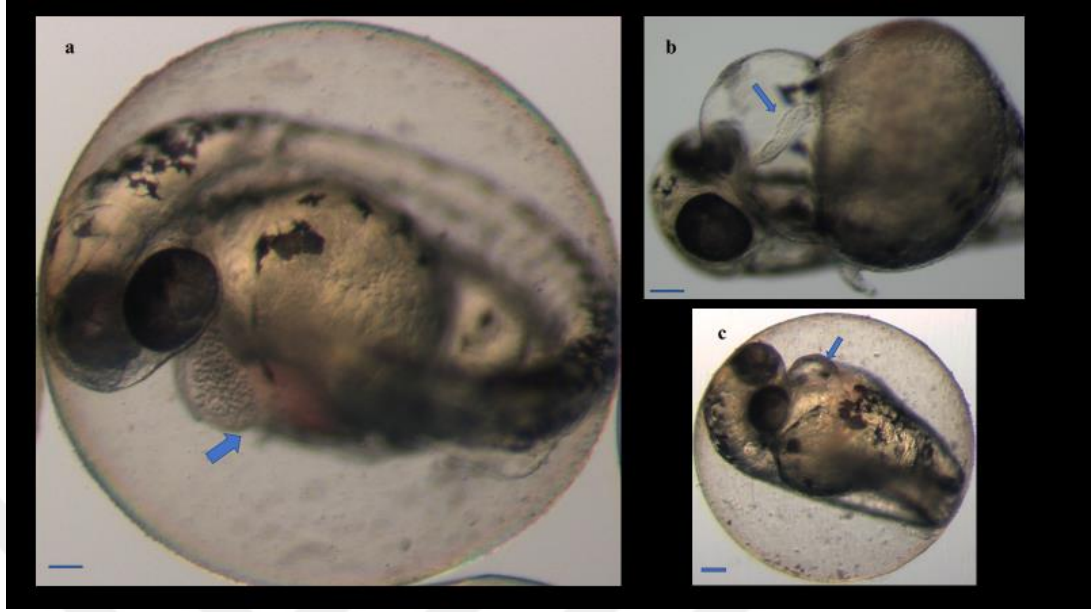
Şekil 4.9. Zebra balığı embriyolarına 750mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a, b) gelişmemiş baş, c) besin kesesi ödemi (ok başı) ve kardiyak ödem (ok). Skala:200µm



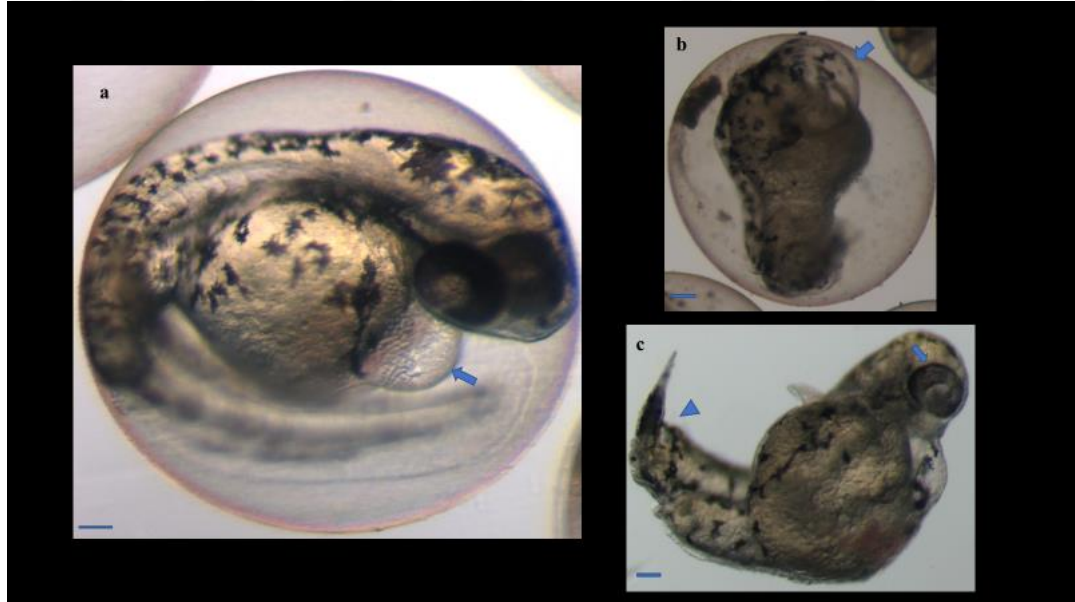
Şekil 4.10. Zebra balığı embriyolarına 1000mg/L n-butanol'ün 24. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem, b) gelişmemiş baş (ok başı) ve kuyruk anormalliği (ok başı), c) besin kesesi ödemi ve somit oluşumu tamamlanmamış, d) baş gelişmemiş, e) küçük göz oluşumu. Skala:200µm.



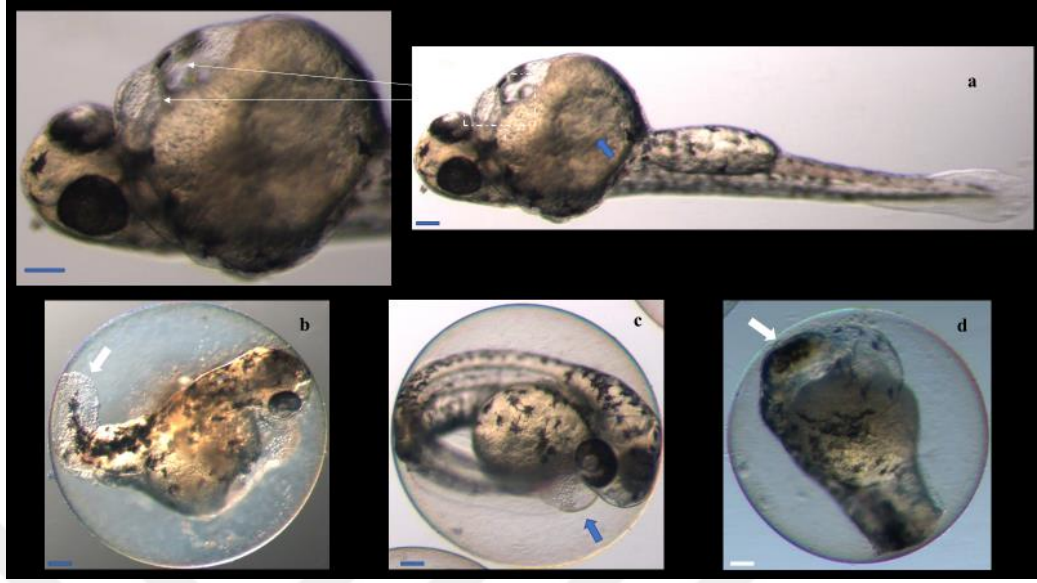
Şekil 4.11. Kontrol grubu 48. saatteki zebra balığı larvası. Skala:200µm



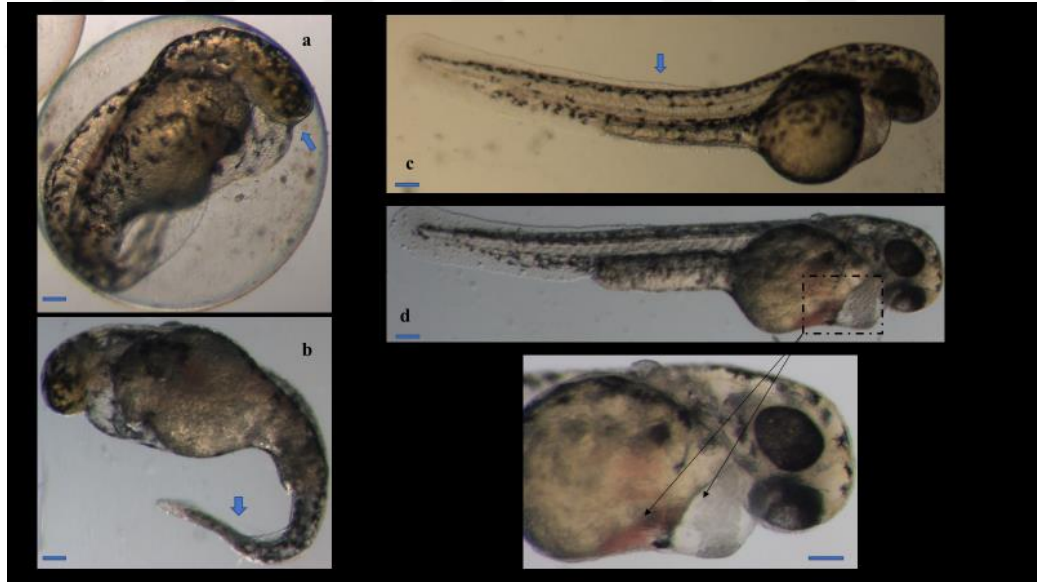
Şekil 4.12. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri a,b,c) kardiak ödem. Skala:200μm.



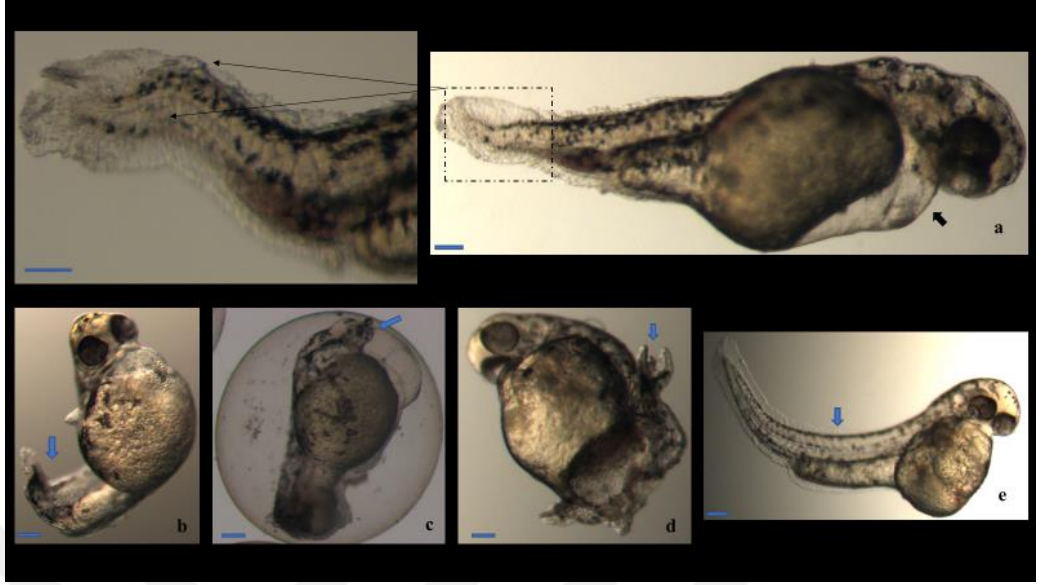
Şekil 4.13. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri a) kardiak ödem, b) gelişmemiş baş, c) siklopi (ok), lordoz ve kuyruk anormallliği (ok başı). Skala:200μm.



Şekil 4.14. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri
 a) kardiyak ödem ve besin kesesi ödemi (ok), b) kuyruk anormaliği, c) kardiyak ödem, d) gelişmemiş baş.
 Skala:200µm



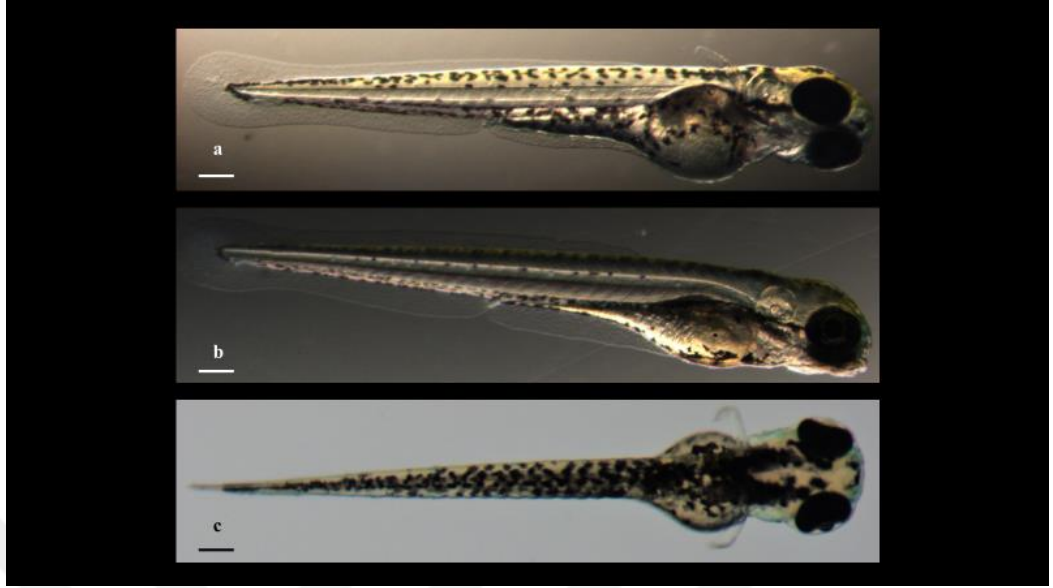
Şekil 4.15. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri
 a) gelişmemiş baş ve kardiyak ödem, b) kardiyak ödem, kuyruk anormaliği ve skolyoz, c) lordoz, d)
 kardiyak ödem ve kan birikmesi. Skala:200µm



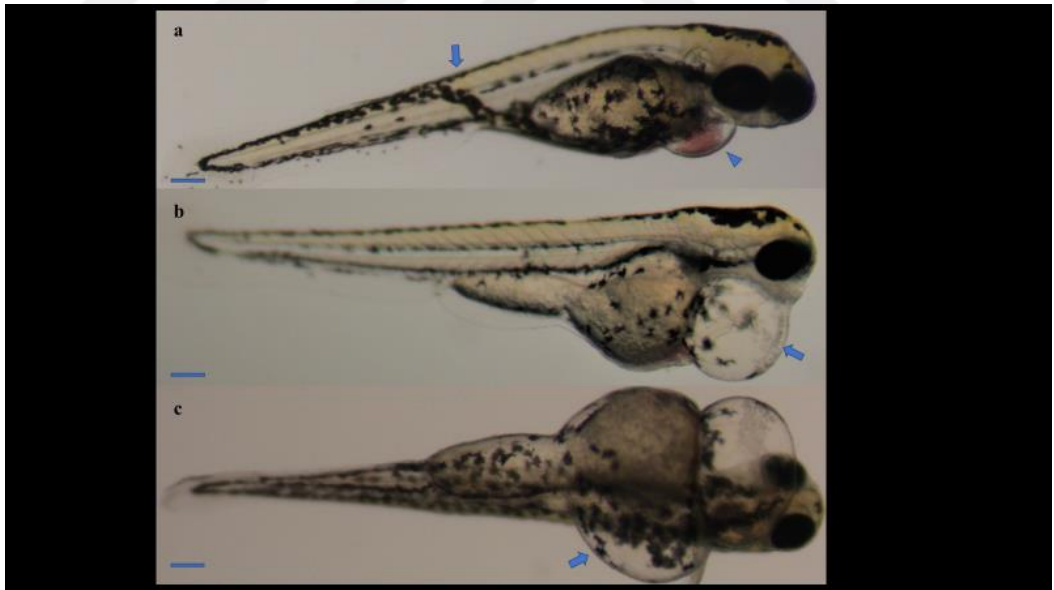
Şekil 4.16. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem (ok) ve kuyruk anormalliliği, b) kuyruk anormalliliği ve lordoz, c) gelişmemiş baş ve küçük gözler, d) kuyruk anormalliliği, e) lordoz. Skala:200µm



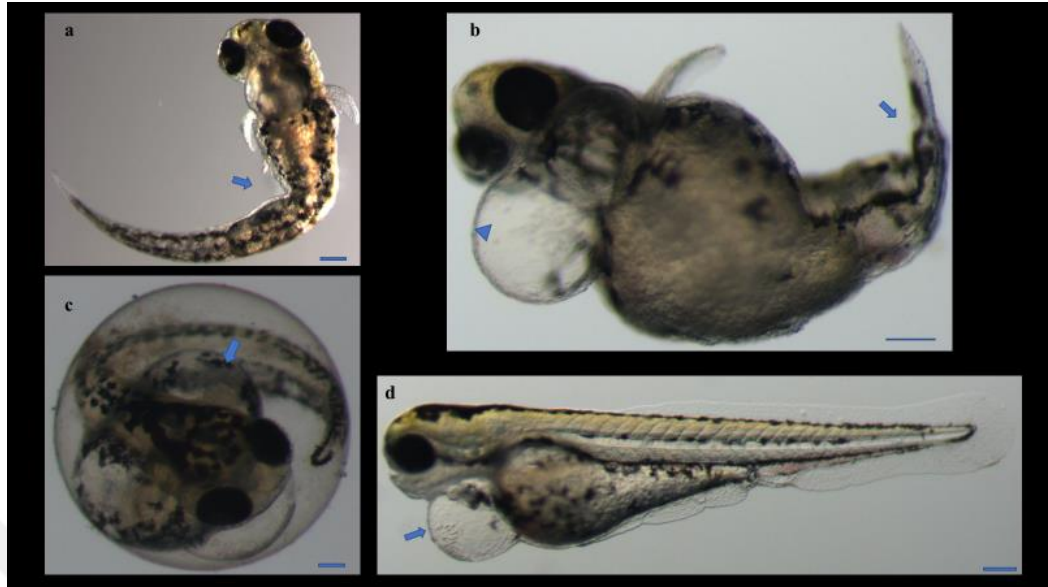
Şekil 4.17. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 48. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem ve kan birikmesi, b) lordoz, c) gelişmemiş baş ve lordoz, d) skolyoz. Skala:200µm



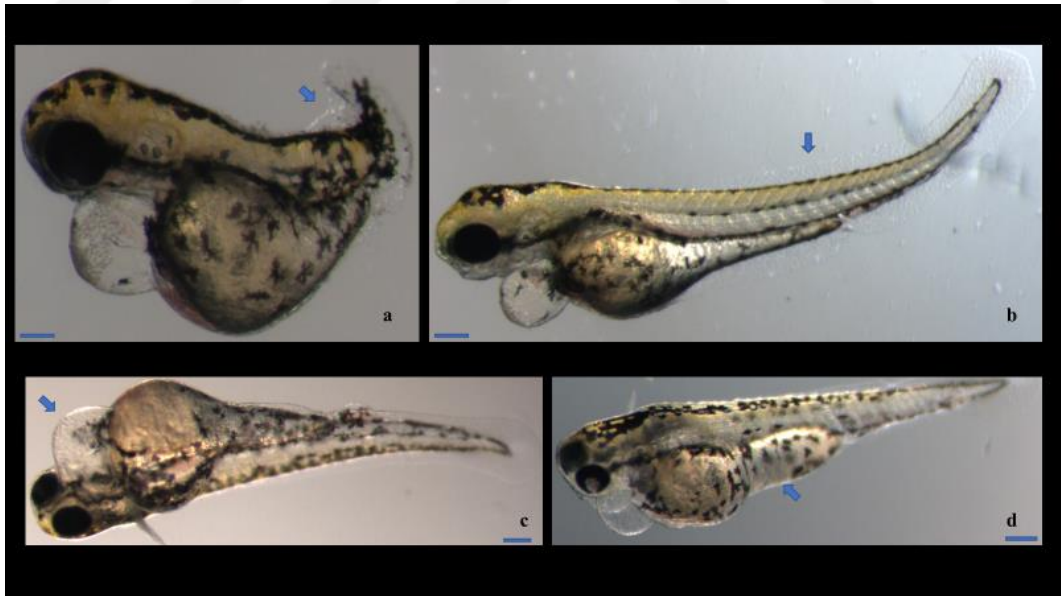
Şekil 4.18. Kontrol grubu 72. saatteki zebra balığı larvası
a,b) lateral, c) dorsal. Skala:200µm



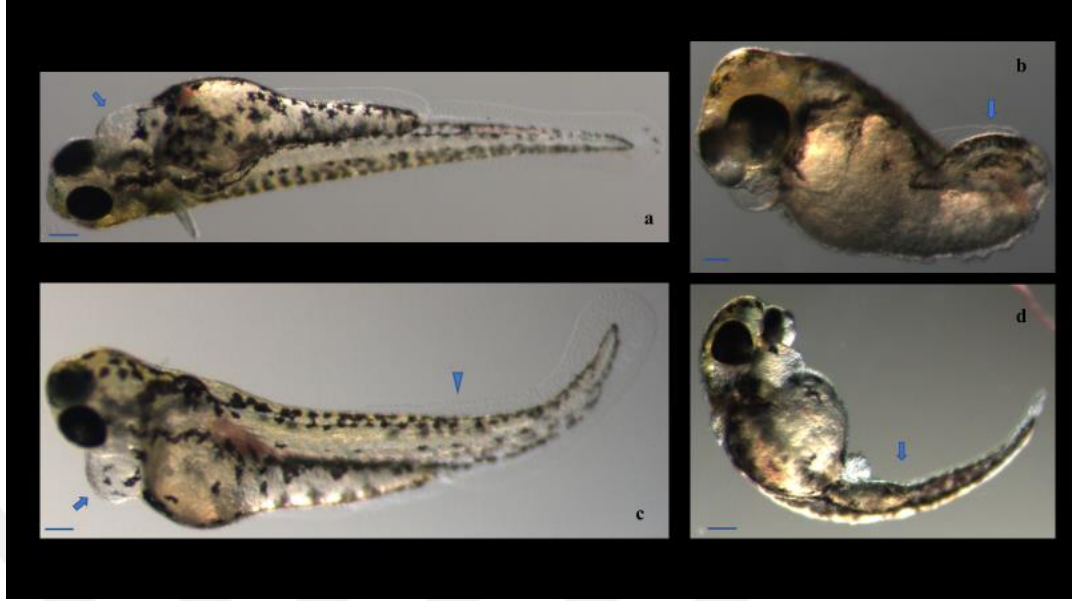
Şekil 4.19. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem (ok başı), skolyoz (ok) ve zayıf pigmentasyon, b) kardiyak ödem ve zayıf pigmentasyon,
c) tüm vücut ödemi (anazarka). Skala:200µm



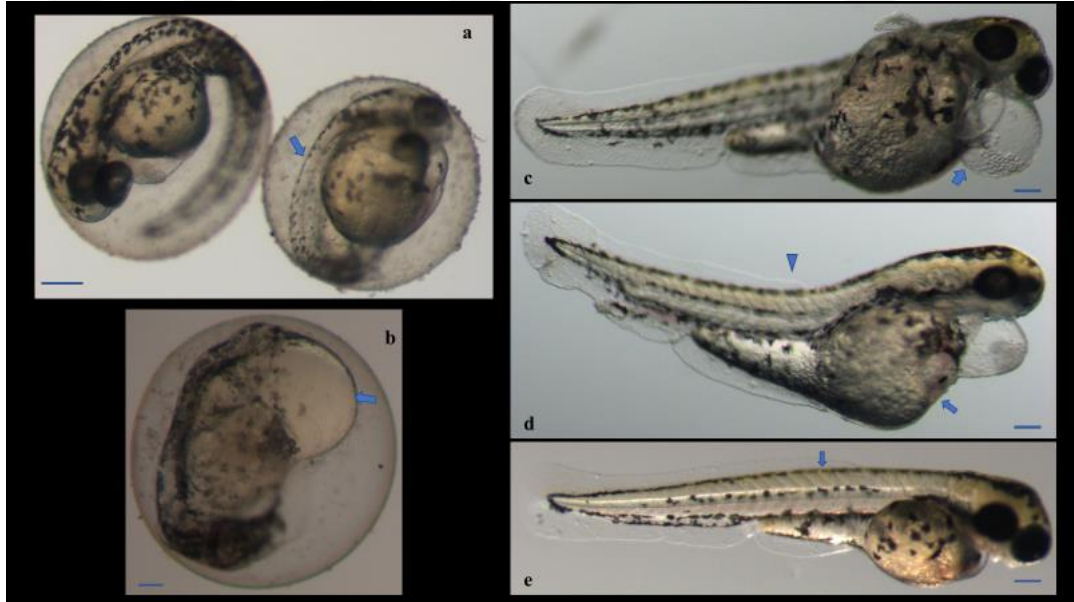
Şekil 4.20. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) skolyoz, b) kardiak ödem (ok başı), kuyruk anormalliği ve lordoz (ok), c) tüm vücut ödemi (anazarka),
d) kardiak ödem ve zayıf pigmentasyon. Skala:200µm



Şekil 4.21. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) kuyruk anormalliği ve kısa boy, b) lordoz ve zayıf pigmentasyon, c) kardiak ödem, d) tüm vücut ödemi
(anazarka). Skala:200µm



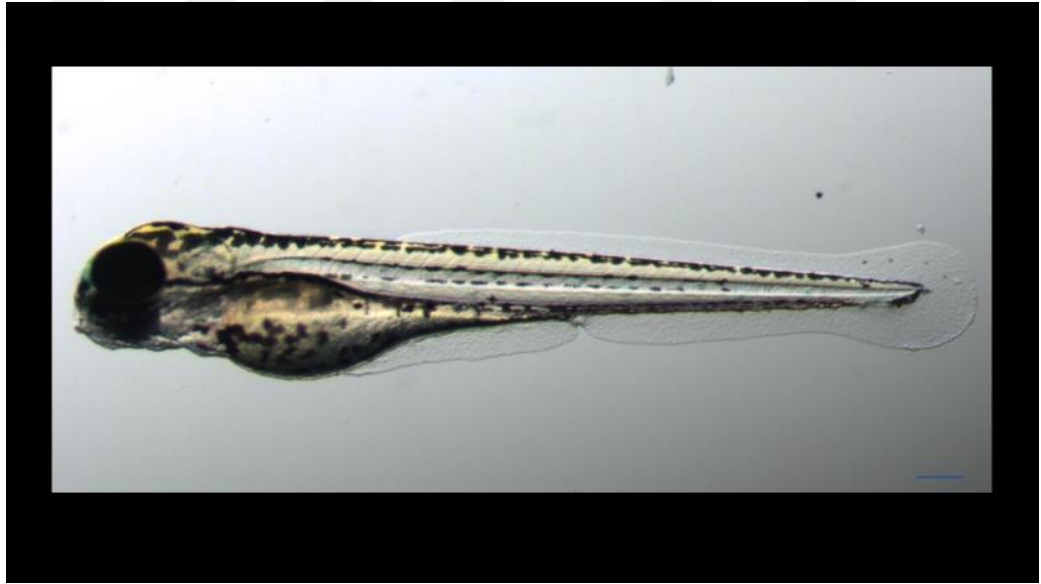
Şekil 4.22. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem, b) kuyruk anormalliği ve yavaş gelişim, c) lordoz (ok başı) ve kardiyak ödem (ok), d) skolyoz. Skala:200µm



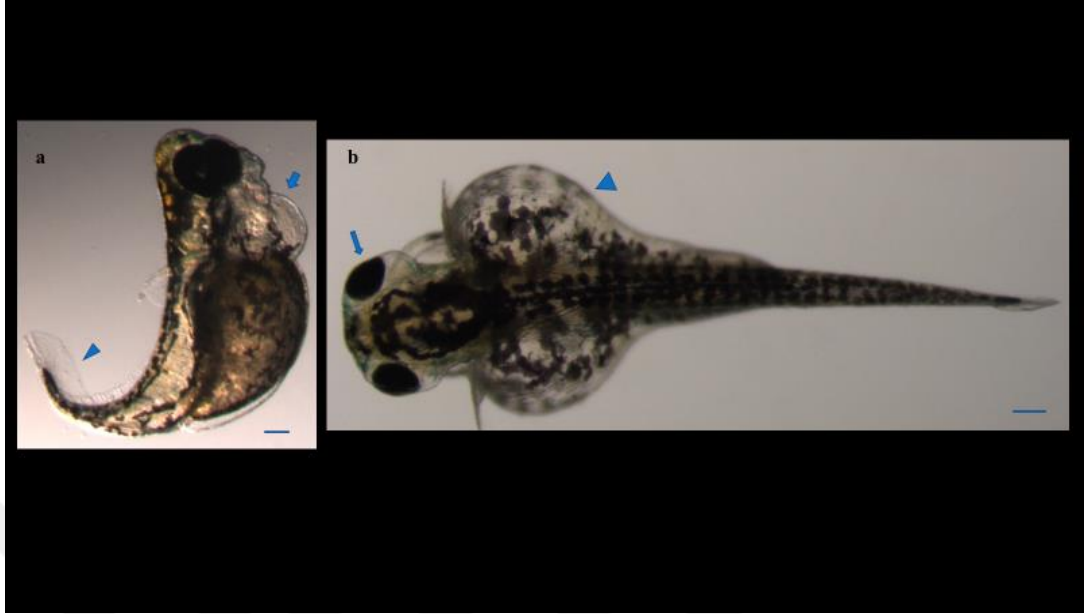
Şekil 4.23. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) zayıf pigmentasyon, b) gelişmemiş baş ve kuyruk anormalliği, c) kardiyak ödem, d) lordoz (ok başı) ve tüm vücut ödemi (anazarka), e) skolyoz. Skala:200µm



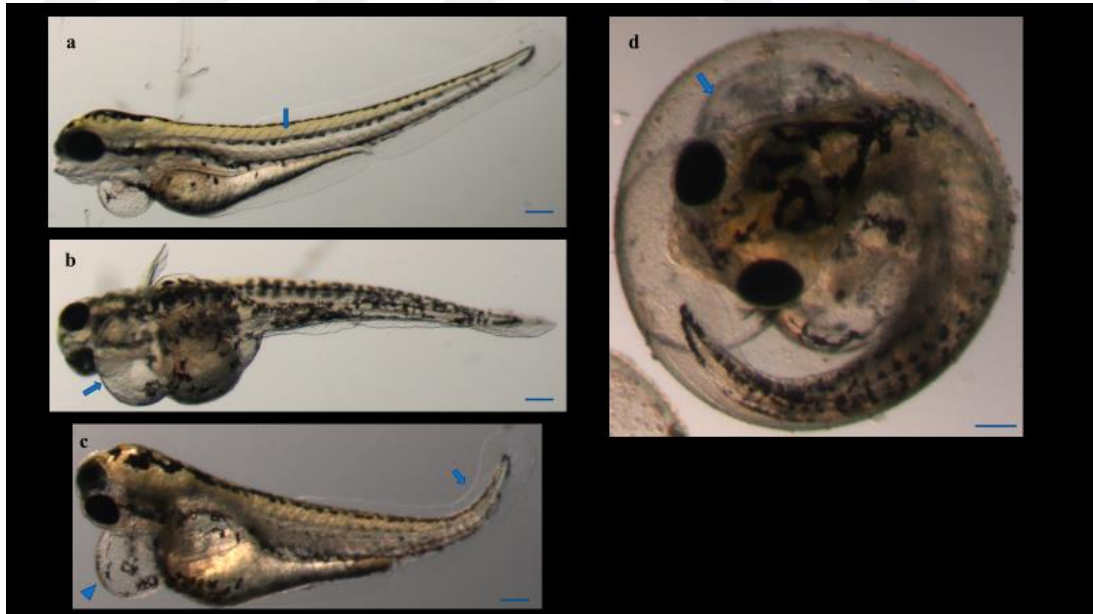
Şekil 4.24. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 72. saatteki etkileri
a) skolyoz, b) tüm vücut ödemi, c) lordoz, d) kardiyak ödem (ok başı), lordoz ve zayıf pigmentasyon (ok).
Skala:200µm



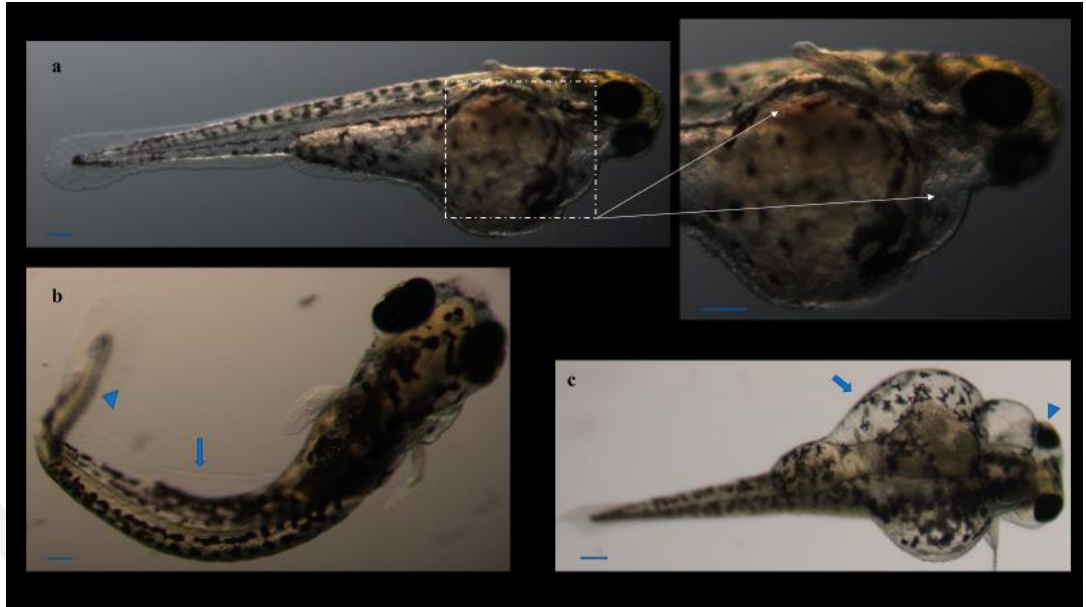
Şekil 4.25. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvası. Skala:200µm



Şekil 4.26. Zebra balığı larvalarına 10 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) kuyruk anormalliği (ok başı), kardiyak ödem(ok) ve gelişim anormalliği, b) tüm vücut ödemi (anazarka) (ok başı), küçük baş ve küçük göz oluşumu (ok). Skala:200µm



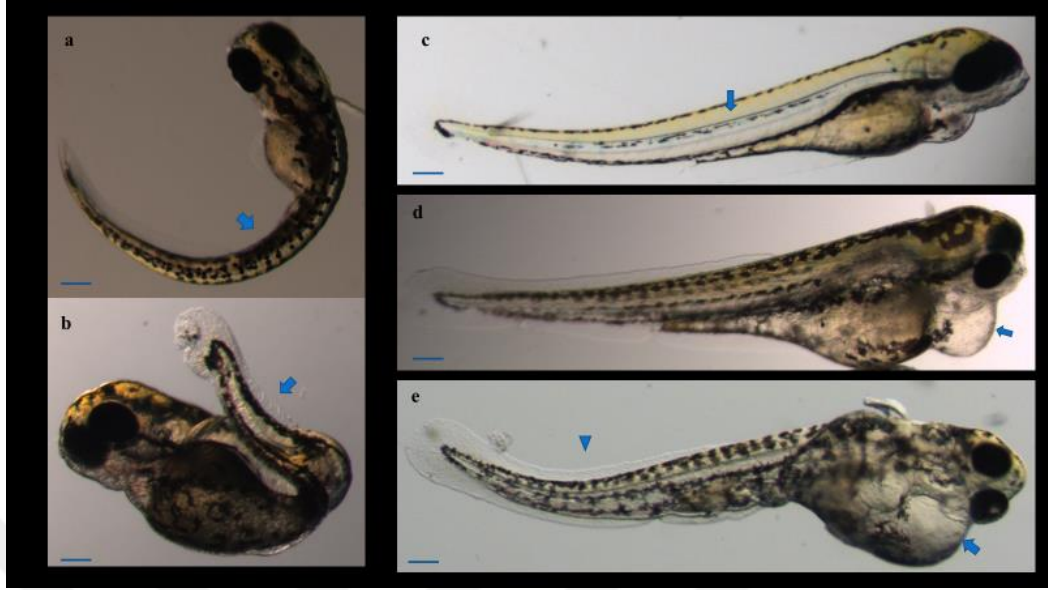
Şekil 4.27. Zebra balığı larvalarına 50 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) zayıf pigmentasyon ve lordoz, b) kardiyak ve besin kesesi ödemi, c) kardiyak ödem (ok başı) ve kuyruk anormalliği (ok), d) tüm vücut ödemi. Skala:200µm



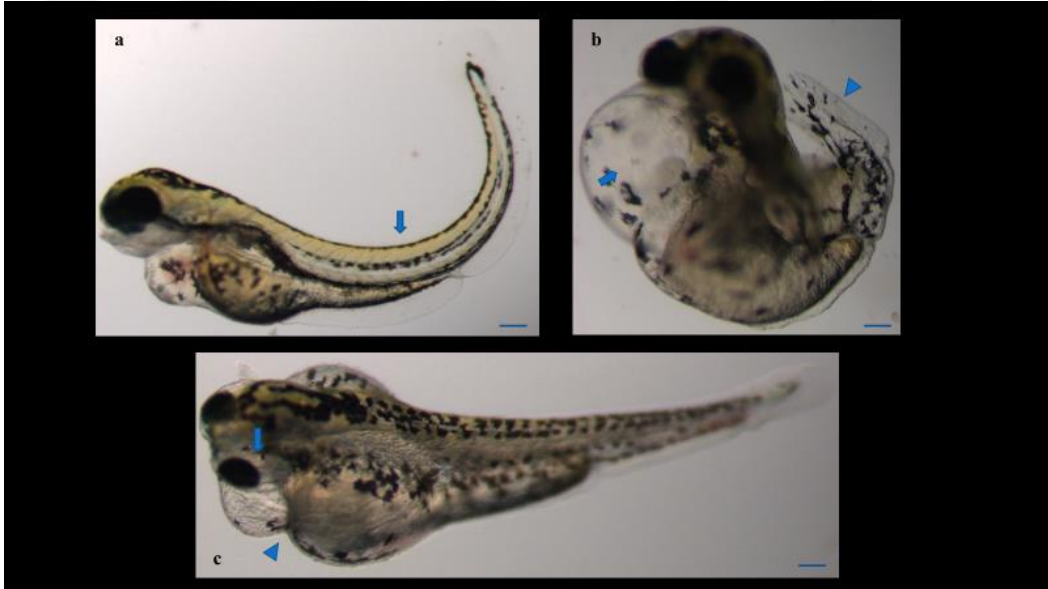
Şekil 4.28. Zebra balığı larvalarına 250 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) kardiyak ödem ve kan toplanması, b) skolyoz (ok) ve kuyruk anormalliği, c) tüm vücut ödemi (ok), küçük baş ve küçük göz oluşumu (ok başı). Skala:200μm



Şekil 4.29. Zebra balığı larvalarına 500 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) siklopi (ok) ve lordoz, b) tüm vücut ödemi (ok) ve küçük baş ve küçük gözler (ok başı), c) zayıf pigmentasyon(ok), kuyruk anormalliği (ok başı), d) skolyoz ve gelişim anormalliği. Skala:200μm



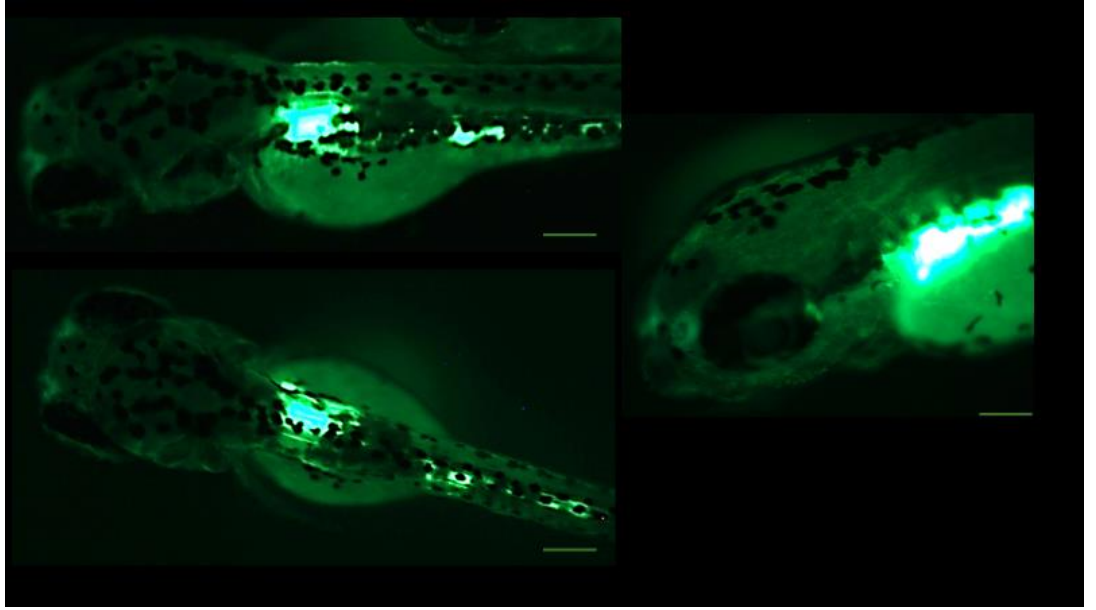
Şekil 4.30. Zebra balığı larvalarına 750 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) skolyoz, b) kuyruk anormalliği ve gelişim anormalliği, c) zayıf pigmentasyon ve lordoz, d) kardiak ödem, e) kardiak ve besin kesesi ödemi (ok), lordoz (ok başı). Skala:200µm



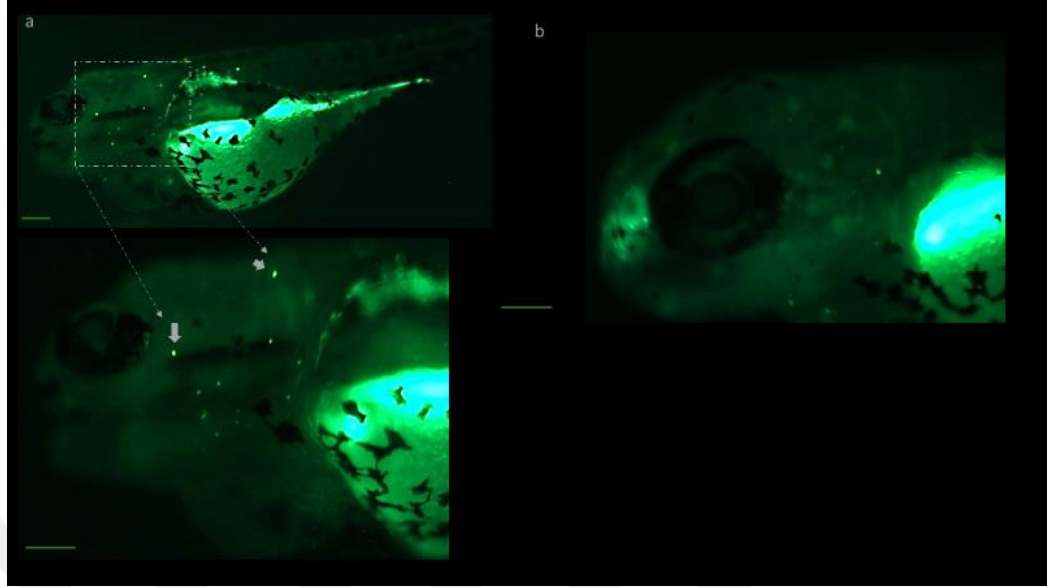
Şekil 4.31. Zebra balığı larvalarına 1000 mg/L n-butanol'ün 96. saatteki etkileri
a) lordoz ve zayıf pigmentasyon, b) kardiak ödem (ok) ve kuyruk anormalliği (ok başı), c) küçük gözler ve küçük baş oluşumu (ok), tüm vücut ödemi (ok başı). Skala:200µm

4.5. CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-Diklorodihidrofloresan Diasetat Asetil Ester) İndikatörü İle Oksidatif Stres

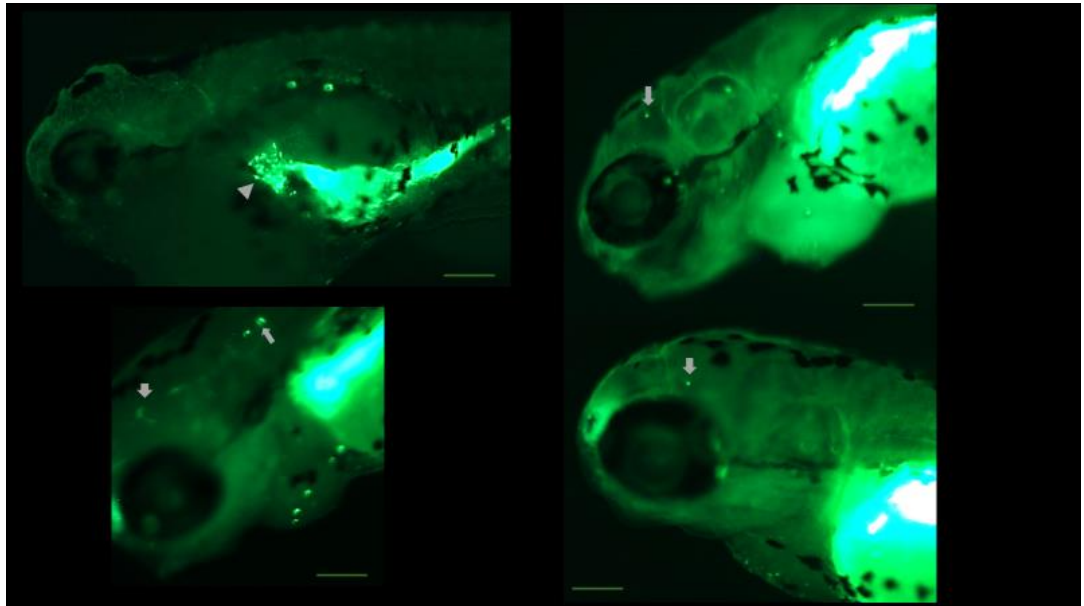
Zebra balığı embriyolarına n-butanol uygulaması sonrası uygulama gruplarında (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) 96. saatte CM-H2DCFDA indikatörü ile inkübasyon sonucunda göz, baş ve karaciğerin bulunduğu farklı bölgelerde yoğun floresan sinyalleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.32-4.36). Özellikle beyin ve karaciğer histopatoloji bulguları ile bazı malformasyon etkilerin gözlemlendiği bölgelerde yüksek dozlarda ROS üretimine bağlı floresan sinyallerde alınması n-butanolün beyin ve karaciğere etkilerini desteklemektedir.



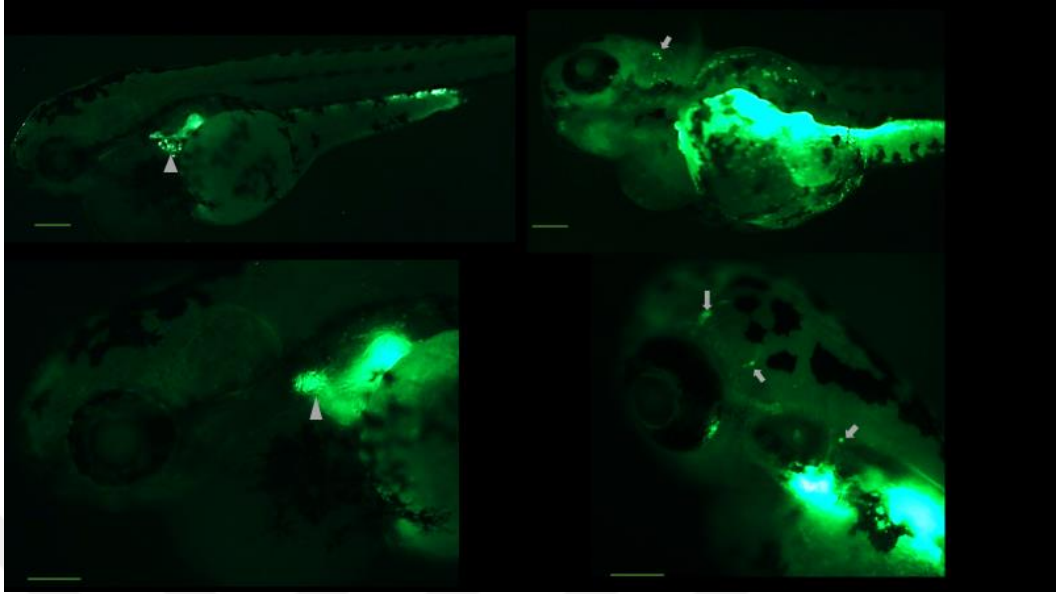
Şekil 4.32. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile floresan oluşumu ile reaktif oksijen türlerinin görünümü. Skala: 600µm



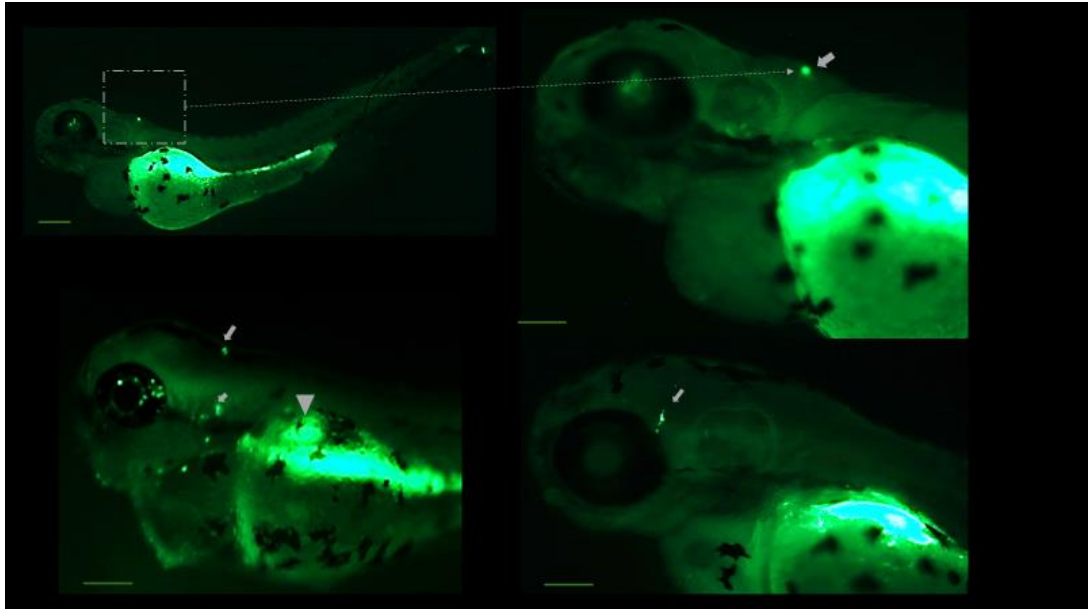
Şekil 4.33. a) 250 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde (ok) reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışıma, b) 50 mg/L n-butanol uygulama grubunun 96.saatteki görünümü. Skala: 600μm.



Şekil 4.34. 500 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışıma (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışıma (ok başı). Skala: 600 μm.



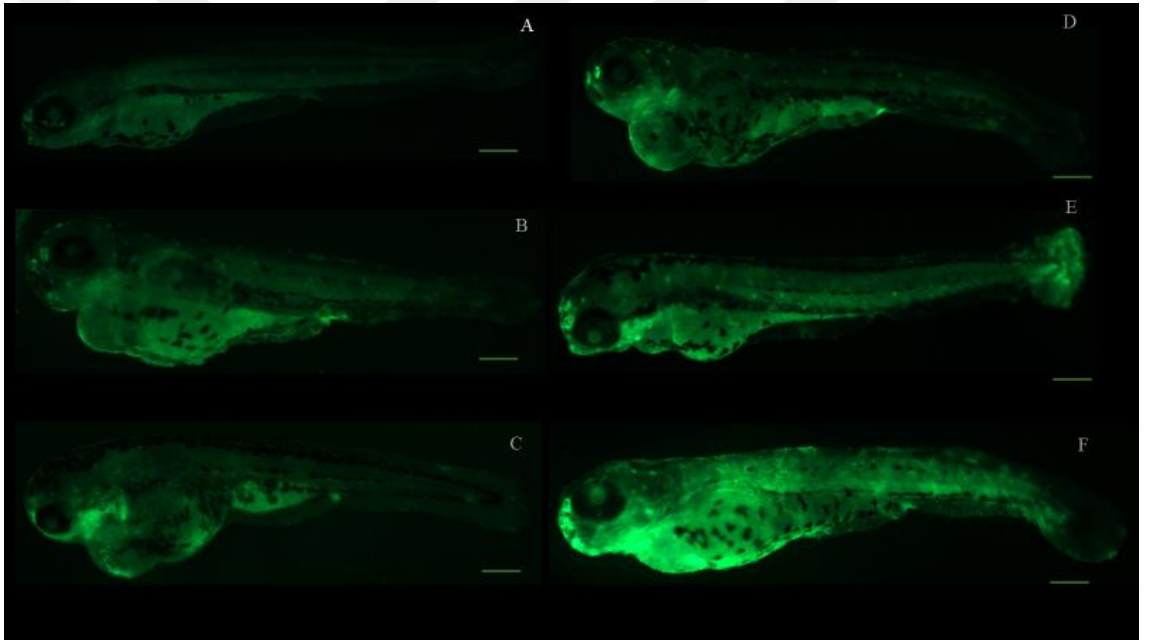
Şekil 4.35. 750 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışımaya (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışımaya (ok başı). Skala: 600 μ m.



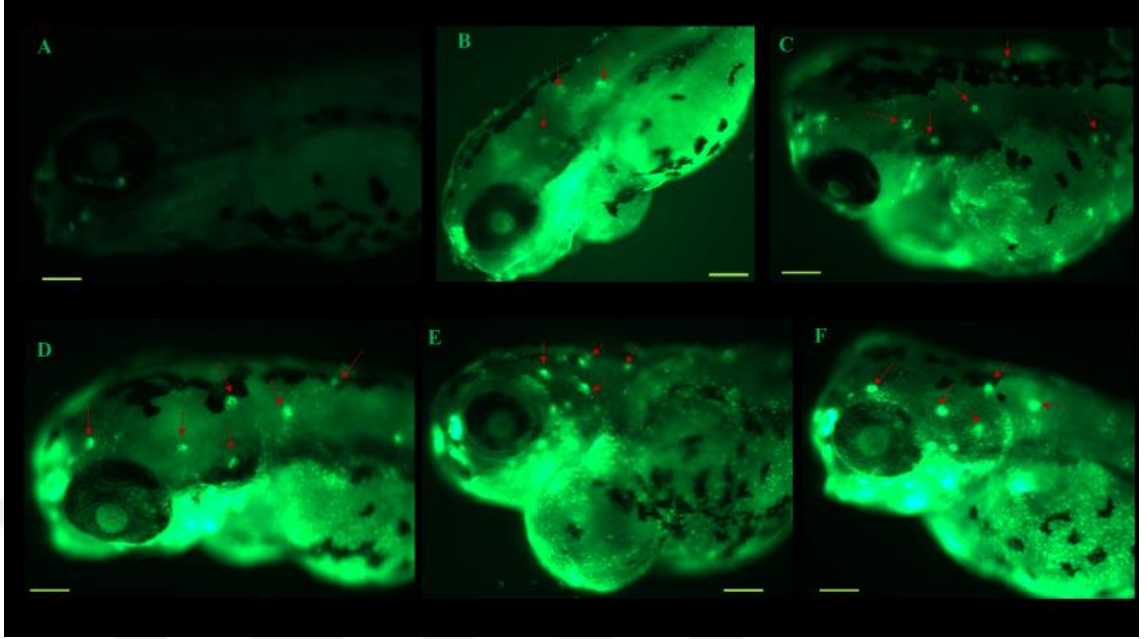
Şekil 4.36. 1000 mg /L n-butanol uygulama grubunun 96. saatteki zebra balığı larvalarında CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester) indikatörü ile reaktif oksijen türlerinin floresan oluşumunun görünümü; ön ve arka beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerindeki artışa bağlı ışımaya (ok), karaciğer bölgesinde reaktif oksijen türlerinde artışa bağlı ışımaya (ok başı). Skala: 600 μ m

4.6. Apoptozis

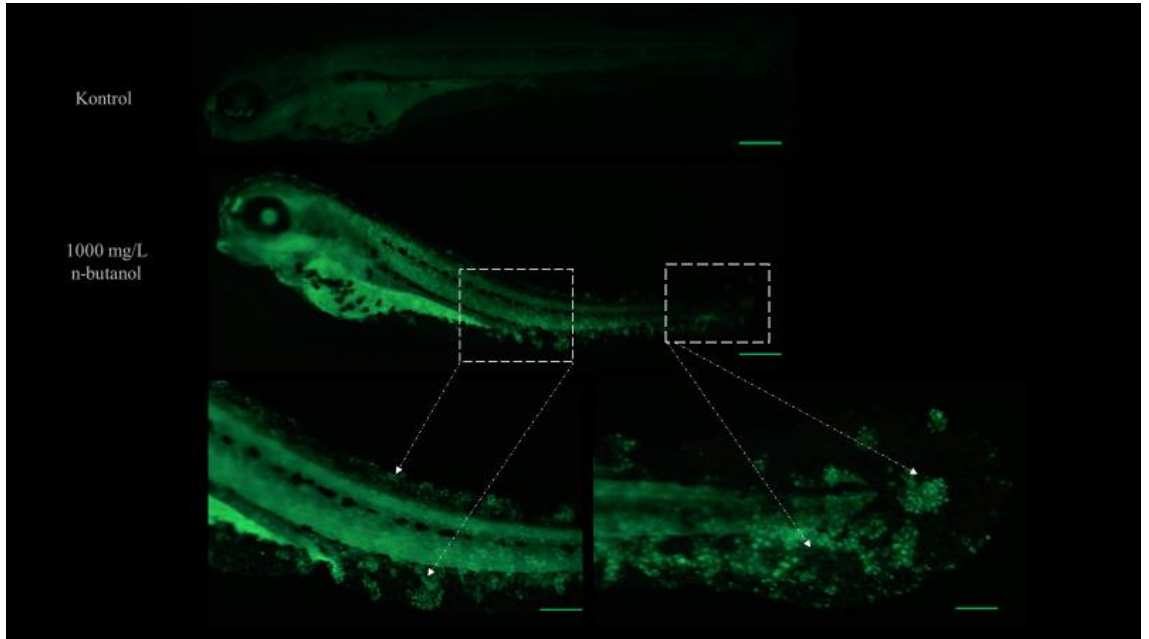
Akridin Oranj (AO) boyama ile apoptotik hücreler belirleme deneyi, n-butanole maruz kalmış canlı zebra balığı larvalarında 96. saatte hücresel ölüm artışına yol açıp açmayacağını tespit etmek için yapılmıştır. N-butanolün tüm vücutta hücre ölümü doz artışına bağlı bir şekilde önemli bir artışa neden olduğunu gözlemlenmiştir (Şekil 4.37). Özellikle zebra balığı larvalarının baş bölgesinde ve deride n-butanolün etkisi ile apoptotik hücrelerde artış belirlenmiştir (Şekil 4.38-4.39).



Şekil 4.37. N-Butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarında etkisine bağlı tüm vücuttaki apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi
A) kontrol, B) 10 mg/L, C) 250 mg/L, D) 500 mg/L, E) 750 mg/L, F) 1000mg/L. Skala: 200 μ m



Şekil 4.38. N-Butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarında beyin bölgesinde etkileri sonucu apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi
A) Kontrol, B) 10 mg/L, C) 250 mg/L, D) 500 mg/L, E) 750 mg/L, F) 1000 mg/L. Skala: 600μm



Şekil 4.39. N-Butanol'ün 96. saatte zebra balığı larvalarındaki etkisine bağlı derideki apoptotik hücrelerin Akridin Oranj boyama ile görüntülenmesi. Skala: 200 μm

4.7. Beyin ve Karaciğer Histopatolojisi

Parafine gömülü bloklardan 4-5 μ m kalınlığında kesitler alınmış ve hematoxilen-eozin ile boyanmıştır. Işık mikroskobu altında x40 büyütmede her gruba ait örneklerde beyin ve karaciğerdeki nekrotik ve dejeneratif değişiklikler incelenmiştir. Tespit edilen histopatolojik bulgular 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta), 3 (şiddetli) olarak derecelendirilmiştir.

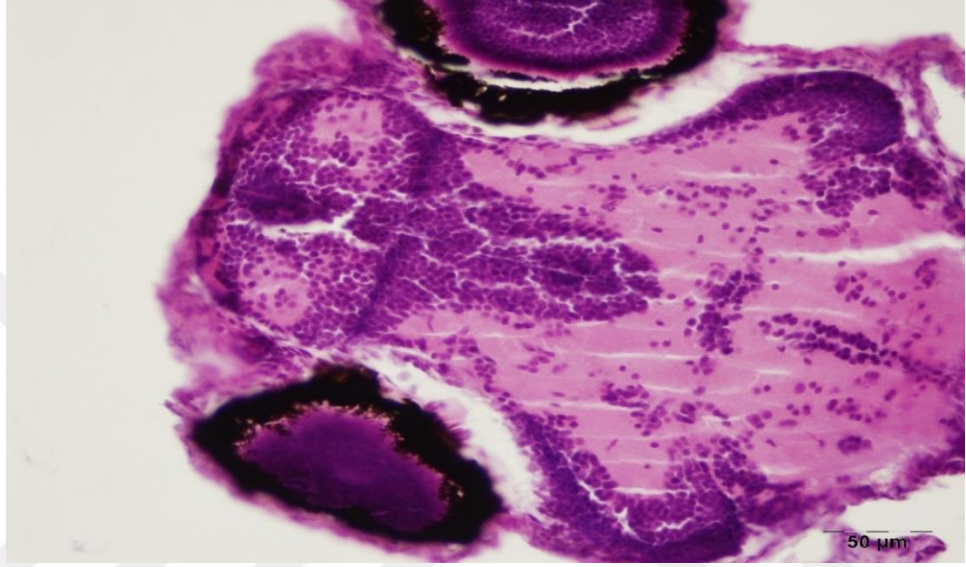
Histopatolojik incelemede beyinde dejeneratif değişiklikler açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$, Çizelge 4.1).

Kontrol, 10, 50 ve 250 mg/L gruplarında dozlarda beyin nörofil kısmında vakuolizasyon açısından önemli fark görülmemiştir ($p > 0,05$, Çizelge 4.2). 500 mg/L'lık doz uygulanan gruptaki örneklerin beyin dokusunda vakuolizasyonun başladığı görülmüş ve doz artmasına bağlı olarak vakuolizasyonun devam ettiği belirlenmiştir. Fakat 500, 750 ve 1000 mg/L'lık doz uygulanan gruplarda kendi aralarında Mann-Whitney U testine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken, bu 3 dozun uygulandığı grupların diğer kontrol, 10, 50 ve 250 mg/L'lık doz uygulanan gruplar arasında vakuolizasyon açısından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,05$, Çizelge 4.2).

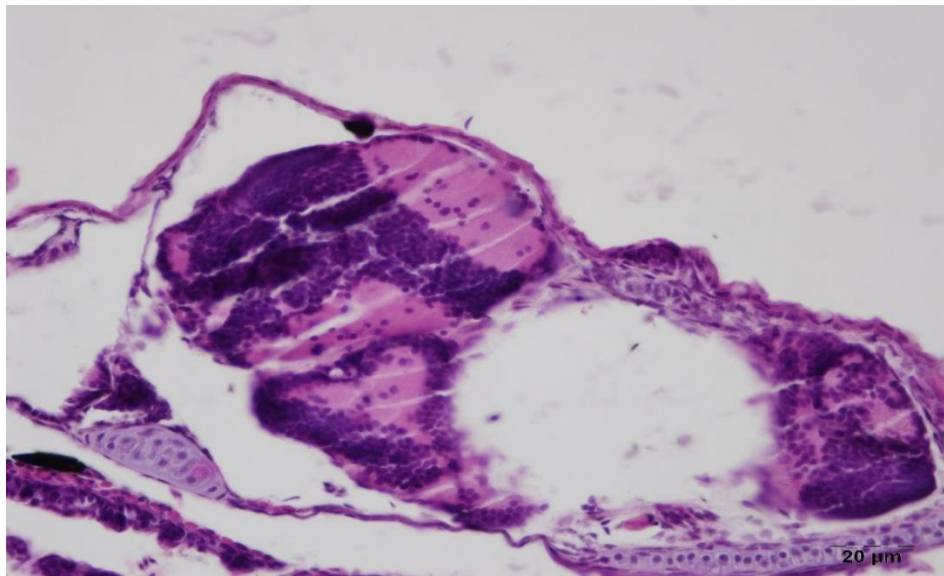
Çizelge 4.2. Farklı dozlardaki n-butanol'ün beyin dokusundaki vakuolizasyon oluşumu

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart hata
Kontrol	0,16 $\pm$ 0,16 ^a
10 mg/L	0,16 $\pm$ 0,16 ^a
50 mg/L	0,83 $\pm$ 0,30 ^a
250 mg/L	0,83 $\pm$ 0,30 ^a
500 mg/L	2,16 $\pm$ 0,16 ^b
750 mg/L	2,66 $\pm$ 0,21 ^b
1000 mg/L	2,66 $\pm$ 0,21 ^b

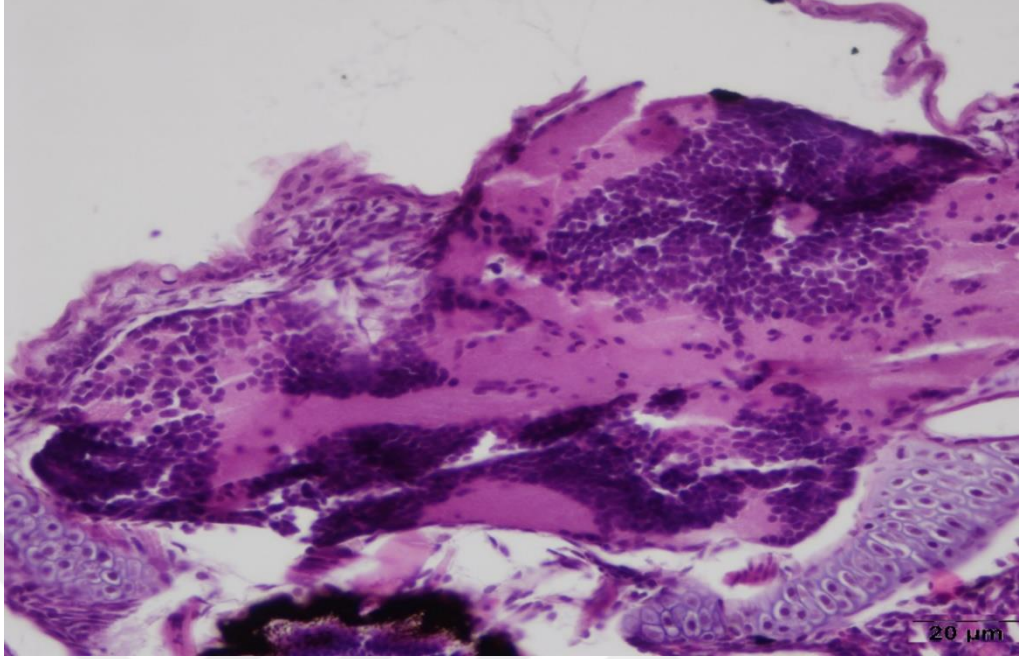
Tespit edilen vakuol oluşumlarının beyinin nötrofil kısmında düzensiz dağılımda olduğu görülmüştür. Bazı vakuollerin oval yapıda olduğu belirlenirken, bazılarının ise yuvarlak yapıda ve birbirleri ile bitişik olduğu belirlenmiştir. Oluşan vakollerin bir kısmının içerisinde eozinofilik karakterde olduğu tespit edilmiştir. (Şekil.4.40-4.46).



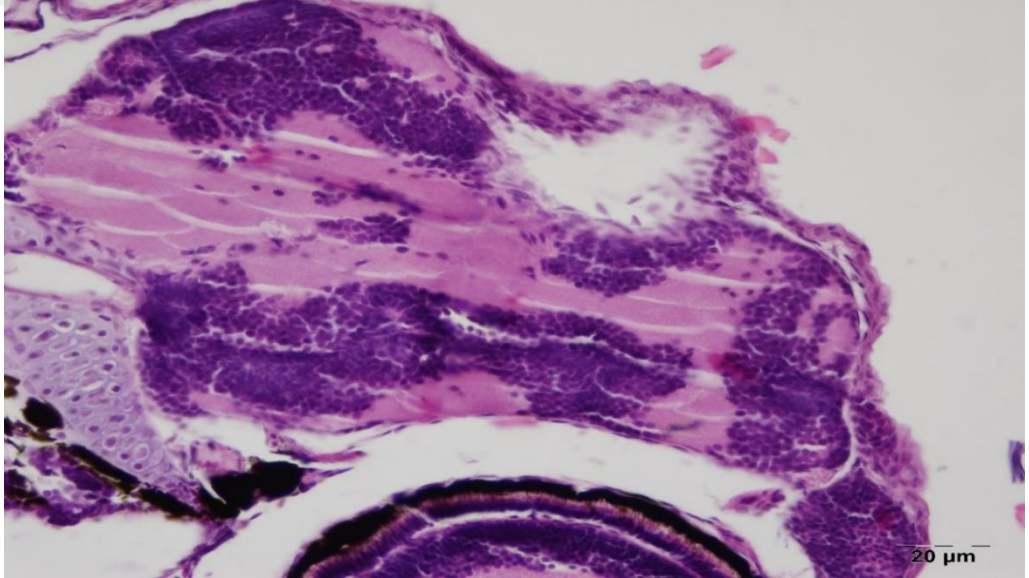
Şekil 4.40. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larva beyin dokusu normal histolojik görünümü



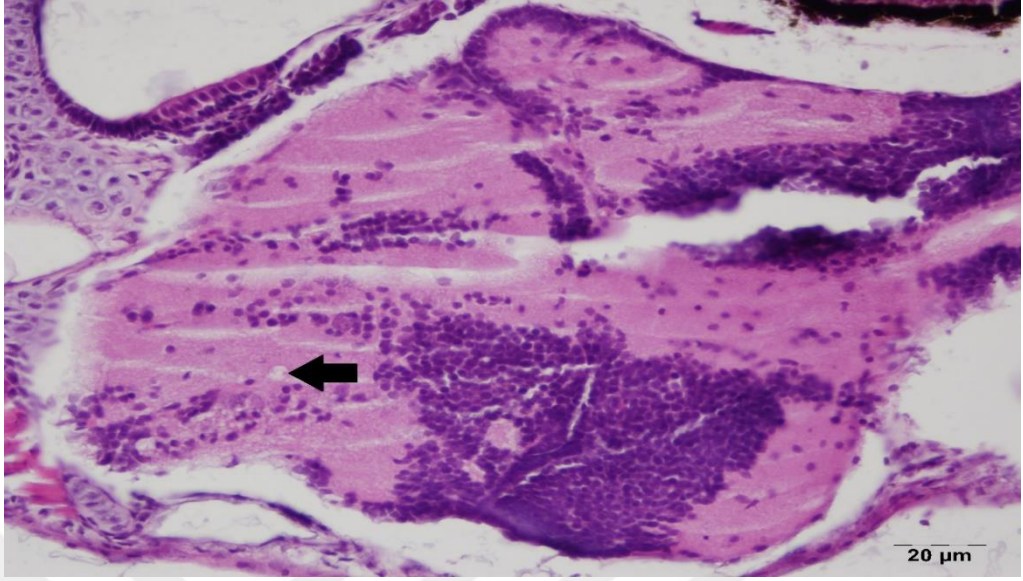
Şekil 4.41. 10 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü



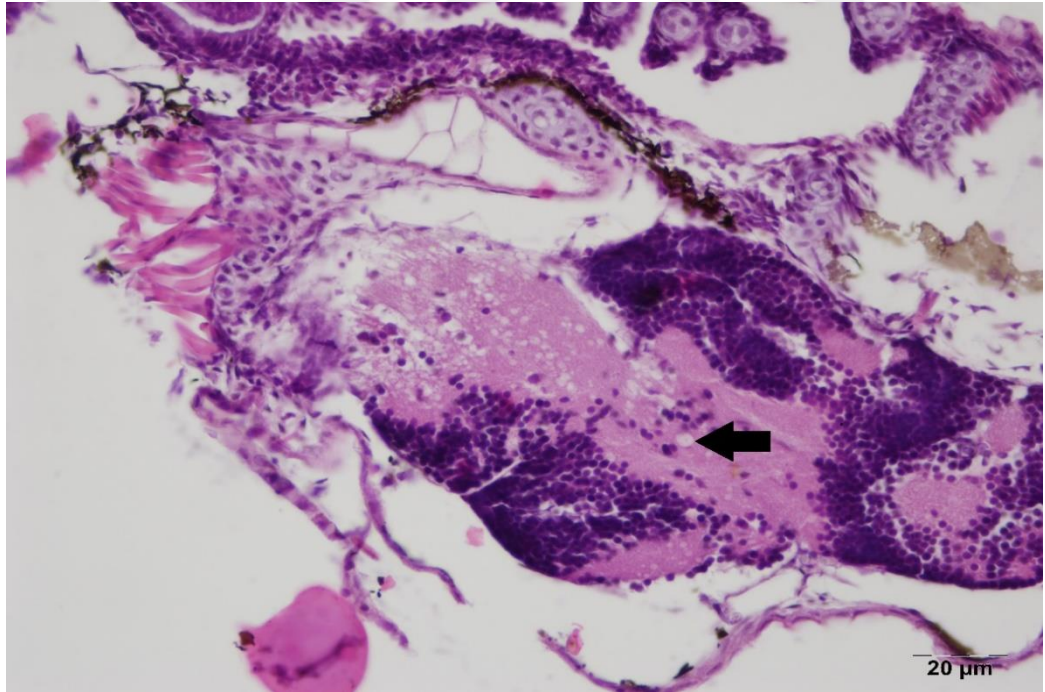
Şekil 4.42. 50 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki beyin dokusu histolojik görünümü



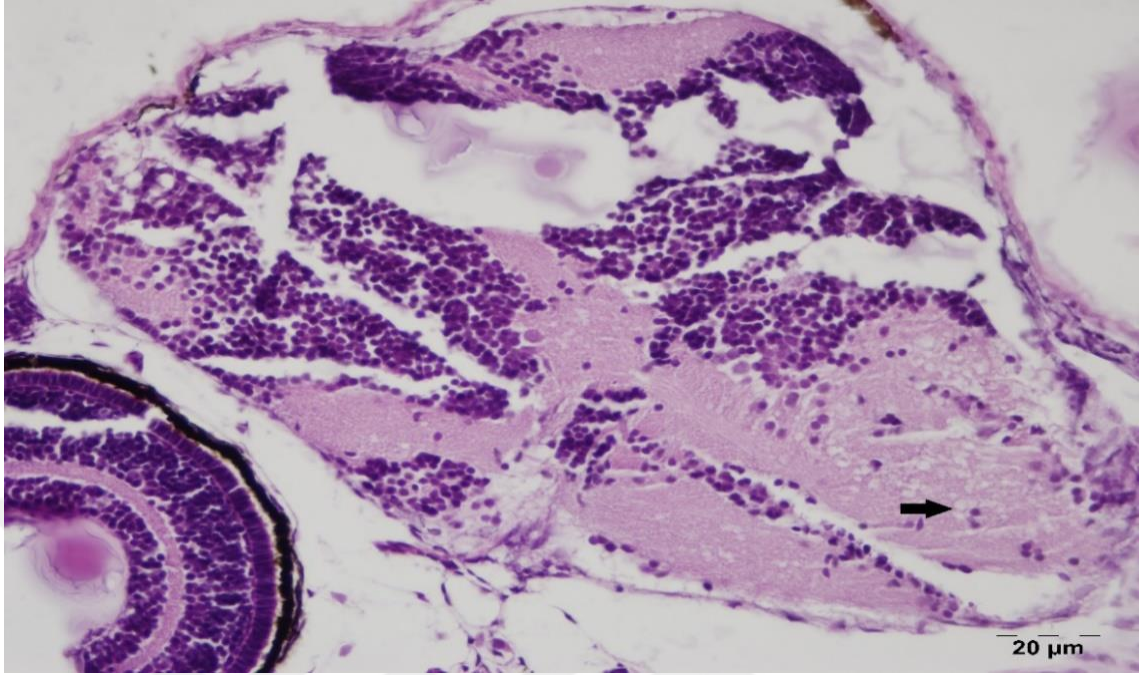
Şekil 4.43. 250 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96.saatteki beyin dokusu histolojik görünümü



Şekil 4.44. 500 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96.saatteki beyin dokusu histolojik görünümü
Oval ve yuvarlak yapıli vakuoller. (ok)



Şekil 4.45. 750 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96.saatteki beyin dokusu histolojik görünümü
Vakuol oluşumu. (ok)



Şekil 4.46. 1000 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96.saatteki beyin dokusu histolojik görünümü
Yuvarlak yapıli birbirleri ile bitişik vakuol oluşumu. (ok)

Karaciğerde histopatolojik olarak hepatositlerde vakuoler dejenerasyon bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p < 0,05$, Çizelge 4.3). Vakuoler dejenerasyon değerlendirilen kontrol ve 10, 50, 250 mg/L'lık doz uygulanan gruplarda fark görülmemiştir ($p > 0,05$, Çizelge 4.3). 500, 750 ve 1000 mg/L doz uygulanan gruplar arasında vakuol oluşumu bakımından fark görülmeyp, diğer gruplarla karşılaştırıldığı zaman Mann-Whitney U testine göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$, Çizelge 4.3). Fakat 500, 750 ve 1000 mg/L doz uygulanan gruplarda karaciğerlerde vakuol oluşumunun belli bir düzeyde arttığı görülmüştür.

Çizelge 4.3. Farklı dozlardaki n-butanol'ün karaciğer dokusundaki vakuol oluşumlarının değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart hata
Kontrol	0,50 $\pm$ 0,34 ^a
10 mg/L	0,83 $\pm$ 0,16 ^a
50 mg/L	0,83 $\pm$ 0,16 ^a
250 mg /L	0,83 $\pm$ 0,16 ^a
500 mg/L	1,50 $\pm$ 0,22 ^b
750 mg/L	1,66 $\pm$ 0,21 ^b
1000 mg /L	2,16 $\pm$ 0,30 ^b

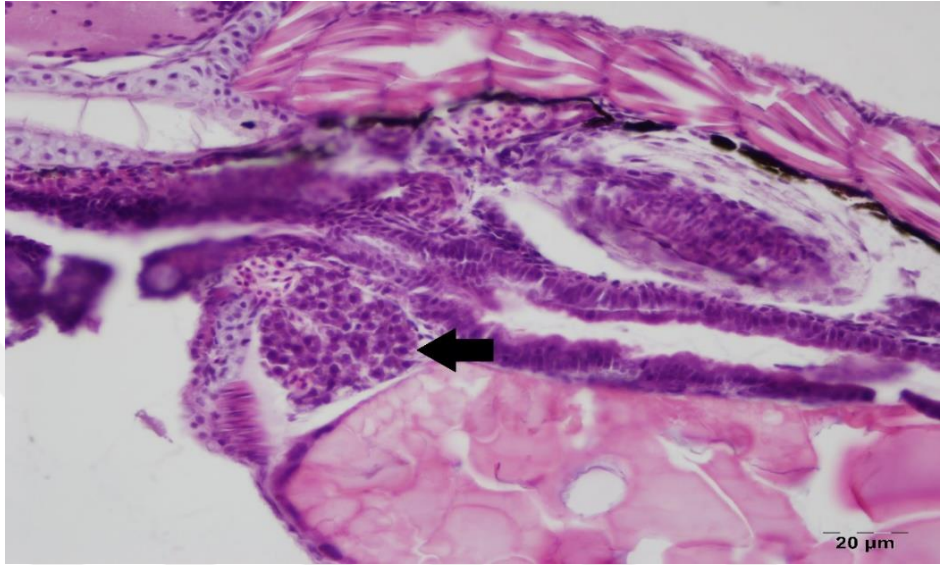
Histopatolojik incelemede vakuollerin hepatositlerde intrasitoplazmik olarak yerleşimli olduğu görülmüştür. Vakuol bulunan hepatositlerin daha şişkin ve sitoplazmasının daha açık renkli olduğu tespit edilmiştir (Şekil.4.47-4.53).

Karaciğerde nekrotik değişiklikler açısından gruplar arasında anlamlı bir fark belirlenmiştir ($p < 0,05$, Çizelge 4.4). Kontrol ile birlikte 10, 50 ve 250 mg/L'lık doz uygulanan gruplarda anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$, Çizelge 4.4). 500, 750, 1000 mg/L'lık doz uygulanan gruplar arasında ise yine anlamlı bir fark görülmemiştir. Diğer gruplarla karşılaştırıldığı zaman 500, 750 ve 1000 mg/L'lık doz uygulanan gruplarda karaciğerdeki nekrotik değişiklikler açısından belirli bir düzeyde artış görülmesine rağmen, Mann-Whitney U testine göre anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p > 0,05$, Çizelge 4.4).

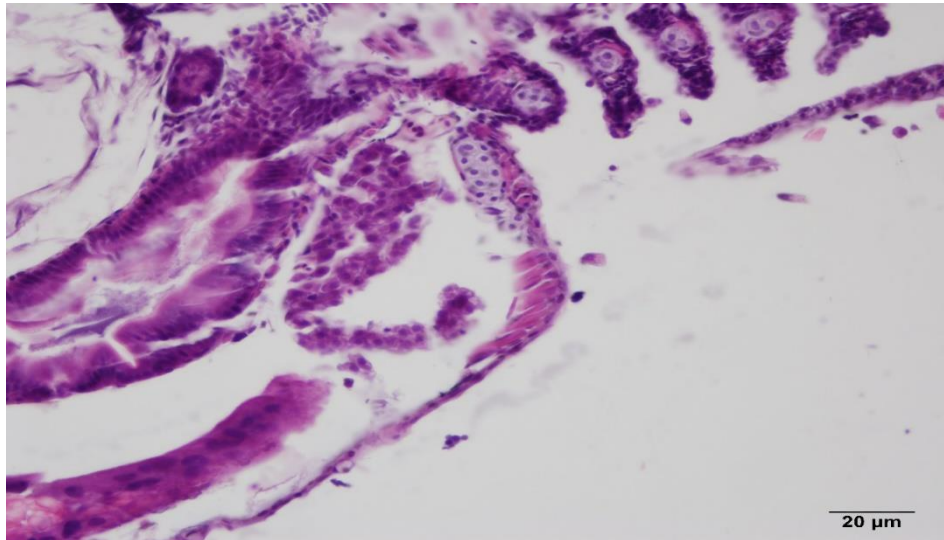
Çizelge 4.4. Farklı dozlardaki n-butanol'ün karaciğer dokusundaki nekrotik değişimlerin değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama $\pm$ Standart hata
Kontrol	0,66 $\pm$ 0,42 ^a
10 mg/L	0,66 $\pm$ 0,21 ^a
50 mg/L	1,00 $\pm$ 0,25 ^a
250 mg/L	1,00 $\pm$ 0,25 ^a
500 mg/L	1,66 $\pm$ 0,21 ^b
750 mg/L	1,50 $\pm$ 0,22 ^b
1000 mg/L	2,16 $\pm$ 0,30 ^b

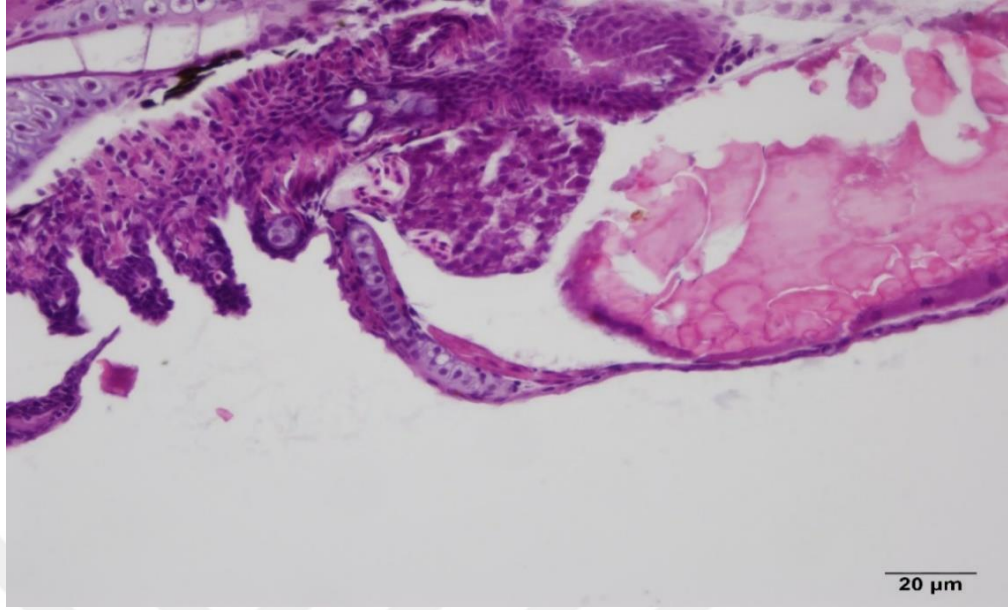
Histopatolojik olarak nekroz şekillenen karaciğerlerde hepatositlerin bazılarında çekirdeklerin piknoza, bazılarında ise çekirdeğin karyolize uğradığı görülmüştür (Şekil.4.47-4.53).



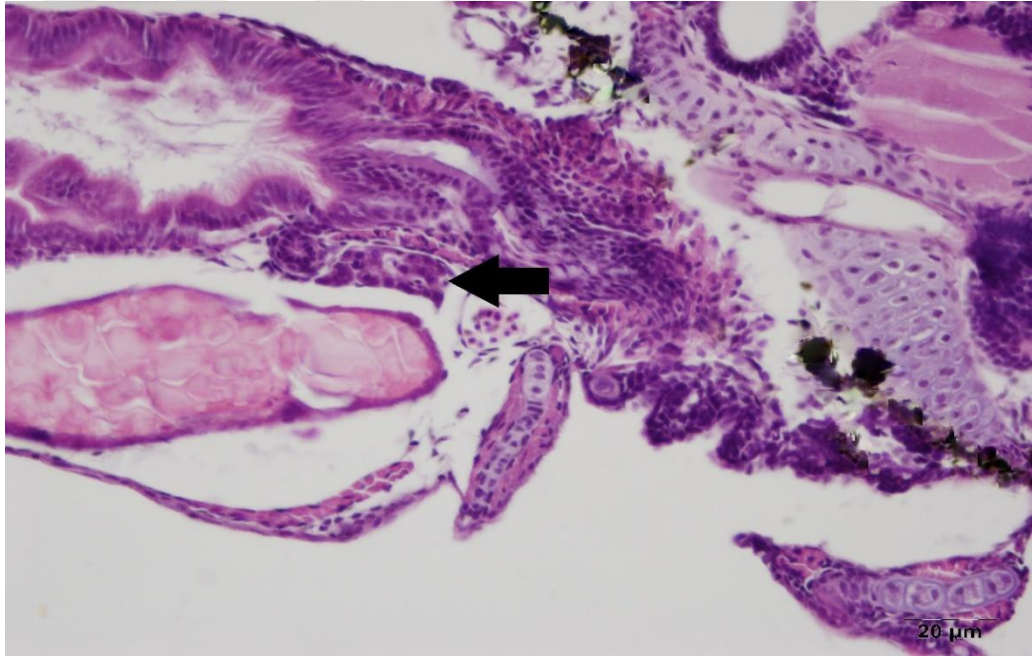
Şekil 4.47. Kontrol grubu 96. saatteki zebra balığı larvası karaciğer dokusu normal histolojik görünümü. (ok)



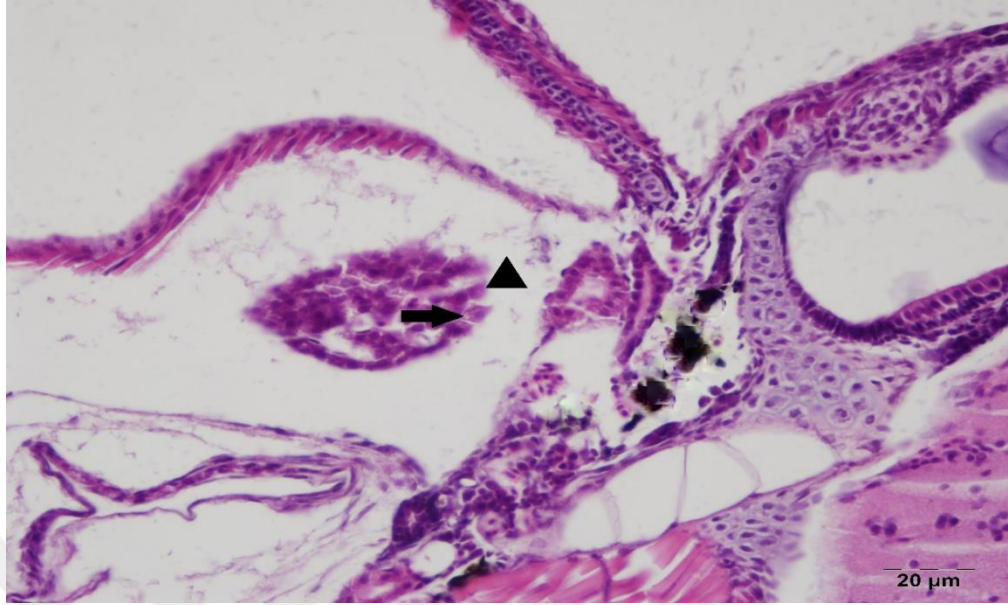
Şekil 4.48. 10 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü



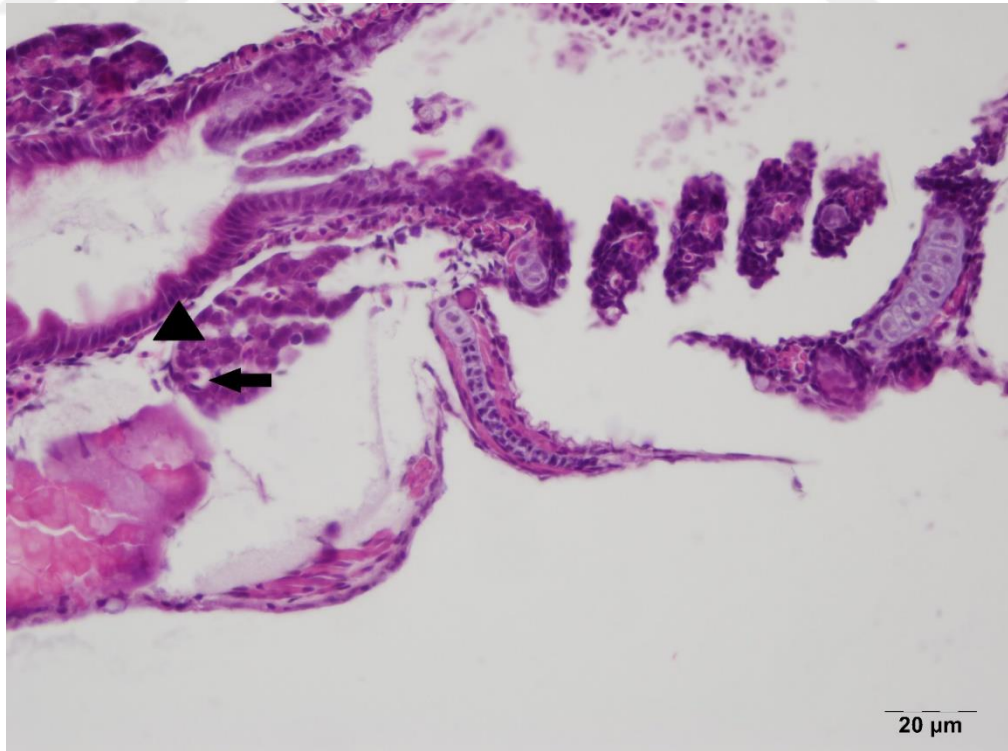
Şekil 4.49. 50 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü



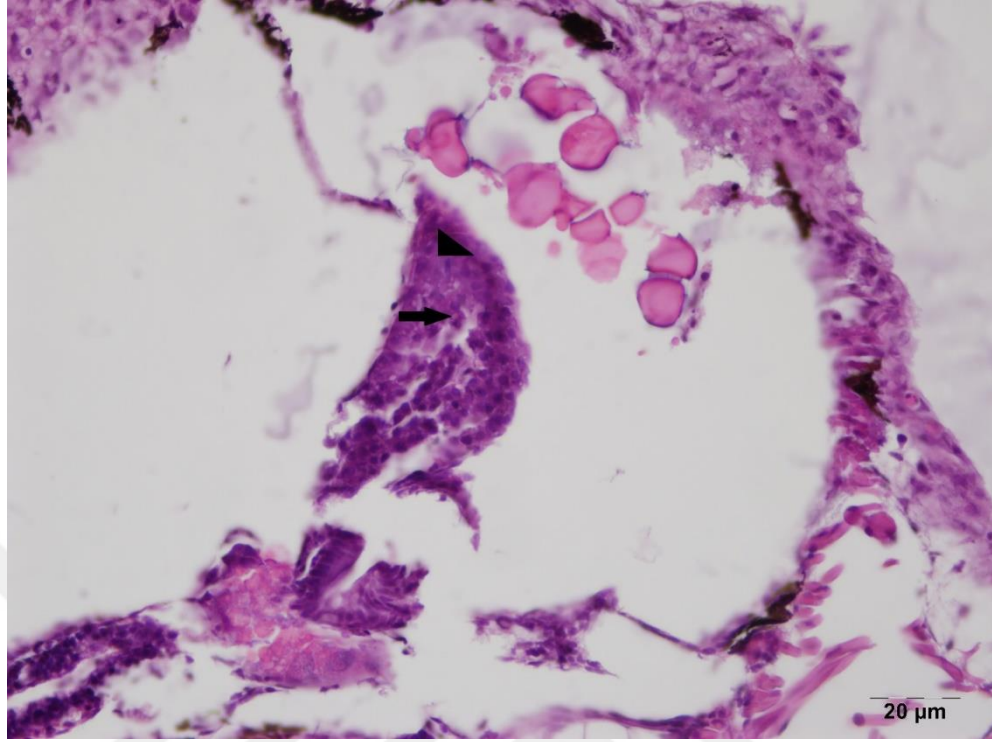
Şekil 4.50. 250 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü. (ok)



Şekil 4.51. 500 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü
Vakuol şekillenmiş şişkin hepatosit (ok) ve nekroz uğramış hepatosit. (ok başı).



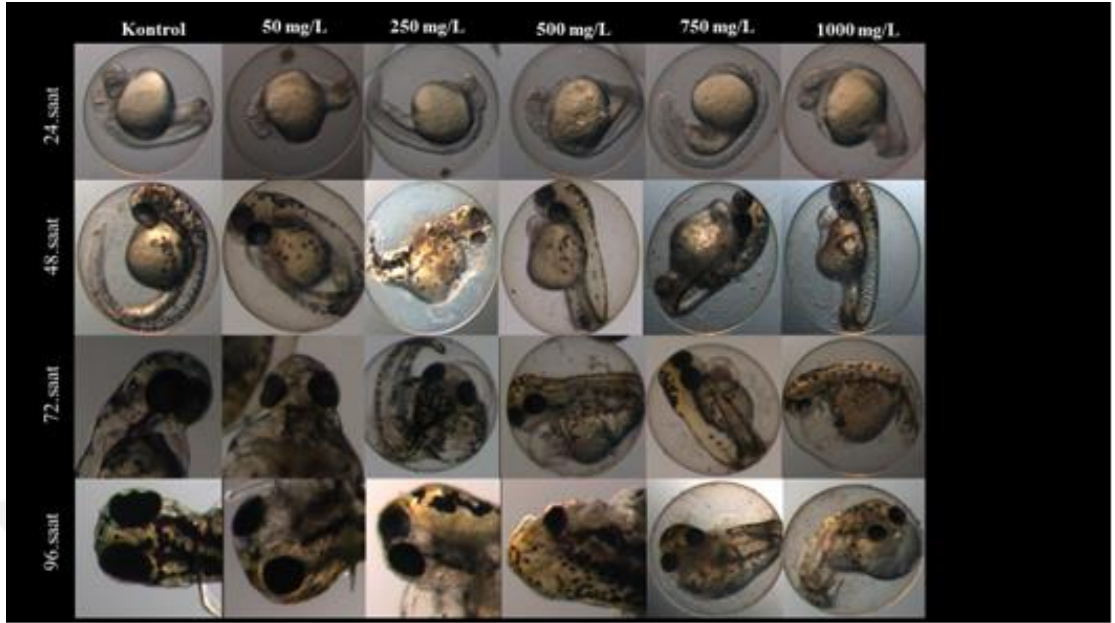
Şekil 4.52. 750 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü
Şişkin solgun yapılı vakuol oluşumu. (ok) Nekroze olmuş hepatosit. (ok başı)



Şekil 4.53. 1000 mg/L n-butanol uygulanan zebra balığı larvasının 96. saatteki karaciğer dokusu histolojik görünümü
Vakuol oluşumu(ok). Nekroz olmuş hepatosit. (ok başı)

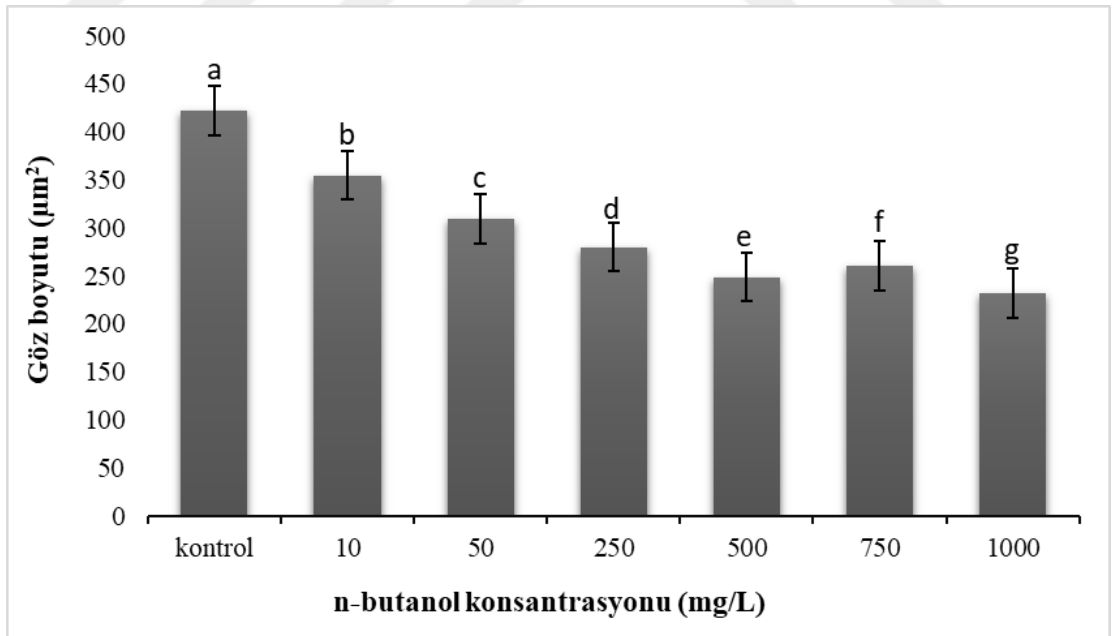
4.8. Göz Boyutu Değişimi

Zebra balığı embriyo ve larvalarında n-butanol uygulaması sonrasında tüm uygulama gruplarında etki oranı değişmekle birlikte gözlerde küçülme (mikroftalmi) ve tek göz oluşumu (siklopi) tespit edilmiştir (Şekil 4.54). Gözlerdeki mikroftalmi oluşumu açısından gruplar arasında anlamlı fark belirlenmiştir ($p < 0,05$, Şekil 4.55). Kontrol, 10, 50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L doz uygulamaları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık görülmüştür ($p < 0,05$, ANOVA, LSD test, Şekil 4.55). Gözlerdeki mikroftalmi, fertilizasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kontrol ile uygulama grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,05$, Two-way ANOVA, Duncan test, Çizelge 4.5).



Şekil 4.54. N-butanol'ün zebra balığı embriyo ve larvalarının göz gelişimi üzerine etkileri

96. saat 500 mg/L siklopi (tek göz), 96. saat 750 ve 1000 mg/L mikroftalmi (küçük göz)



Şekil 4.55. N-butanol'ün farklı dozlarına bağlı olarak zebra balığı embriyo ve larvalarının göz boyutlarındaki değişimler

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış olup deneme 4 tekrar olarak yapılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. ($n = 4$, her grup için 40 yumurta)

Çizelge 4.5. N-butanol'ün fertilizasyondan sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki zebra balığı embriyo ve larvalarının göz gelişimi üzerine etkileri

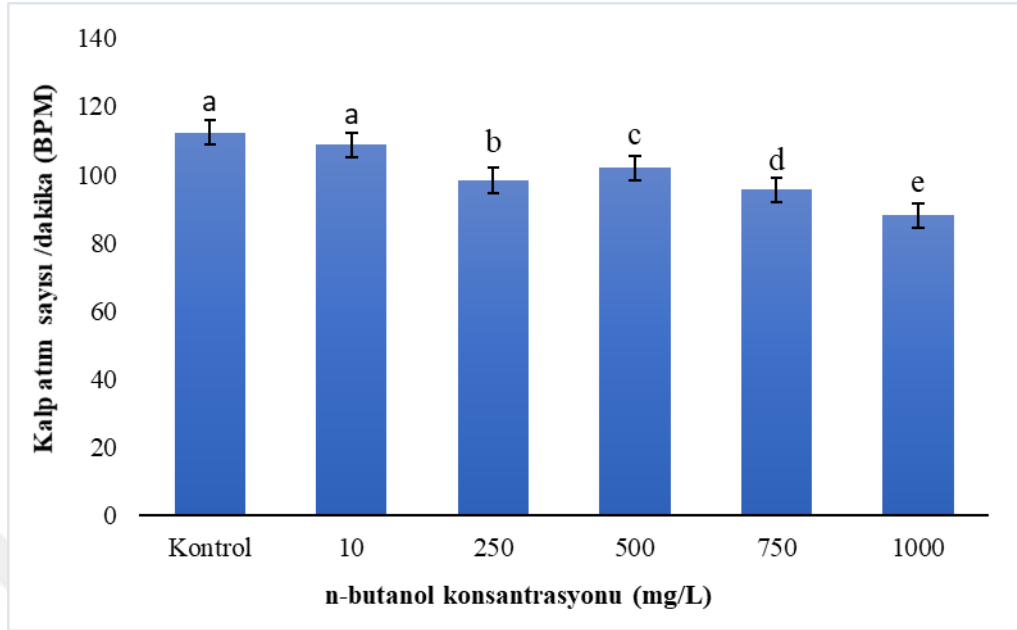
Gruplar	Göz Boyutu (μm^2)			
	24. saat	48. saat	72. saat	96. saat
Kontrol	262,13 $\pm$ 13,30 ^a	392,20 $\pm$ 9,23 ^a	457,95 $\pm$ 22,79 ^a	563,53 $\pm$ 13,74 ^a
10 mg/L	234,52 $\pm$ 7,20 ^b	357,64 $\pm$ 17,54 ^b	425,96 $\pm$ 31,64 ^b	562,60 $\pm$ 35,19 ^b
50 mg/L	211,74 $\pm$ 12,27 ^c	301,55 $\pm$ 22,37 ^c	407,76 $\pm$ 30,28 ^c	417,93 $\pm$ 49,65 ^c
250 mg/L	204,82 $\pm$ 9,24 ^d	303,61 $\pm$ 22,94 ^d	322,72 $\pm$ 37,09 ^d	323,00 $\pm$ 13,57 ^d
500 mg/L	203,41 $\pm$ 9,82 ^e	274,91 $\pm$ 9,28 ^e	288,02 $\pm$ 22,96 ^e	255,13 $\pm$ 19,71 ^e
750 mg/L	223,92 $\pm$ 8,51 ^f	285,34 $\pm$ 4,84 ^f	276,02 $\pm$ 6,89 ^f	278,17 $\pm$ 7,45 ^f
1000 mg/L	194,71 $\pm$ 5,32 ^g	260,01 $\pm$ 4,29 ^g	226,97 $\pm$ 12,98 ^g	262,86 $\pm$ 10,90 ^g

Değerlerin her biri ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. (Two-way ANOVA, Duncan test). (n=4, her grup için 40 yumurta)

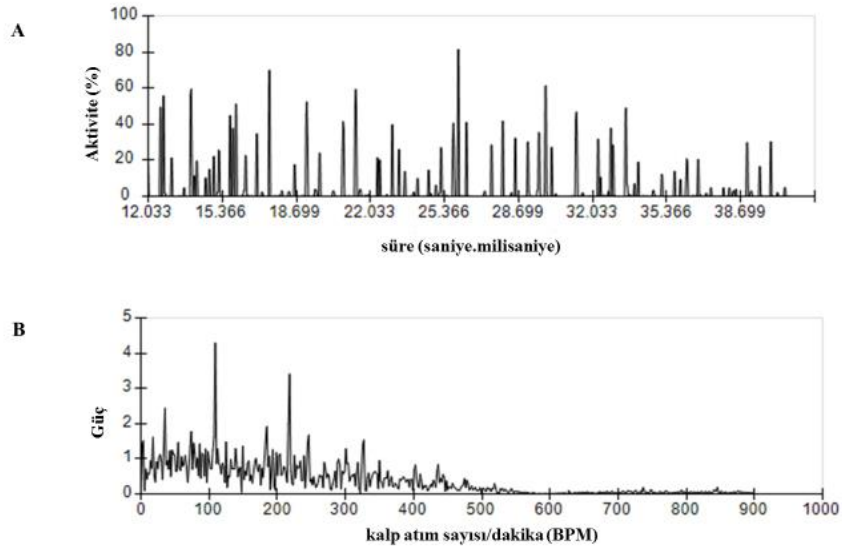
4.9. Kalp Atış Hızı, Kalp Aktivitesi ve Morfolojisi

Kalp atış hızındaki değişiklikler açısından zebra balığı embriyo ve larvalarına n-butanol uygulaması sonrasında kontrol ile farklı dozlardaki gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık belirlenmiştir ($p < 0,05$, Şekil.4.56). LSD testine göre kontrol ile 10 mg/L doz uygulaması arasında anlamlı fark görülmezken diğer dozlar (250, 500, 750 ve 1000 mg/L) ile kontrol grubu arasında anlamlı fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$, Şekil.4.56). Ayrıca 96. saatteki larvalarda, n-butanol uygulanan gruplar ve kontroldeki kalp aktivitesi oranı ile kalp kasılma gücünün sonuçları da kalp atış hızındaki değişimlerle paralellik gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.57-4.62). N-Butanol uygulaması yapılmış zebra balığı larvalarının 96. saatteki kalp morfolojisi incelendiğinde kalbin ventrikül yapısında genişleme ve atriumda inceltme gözlemlenmiştir (Şekil 4.63).

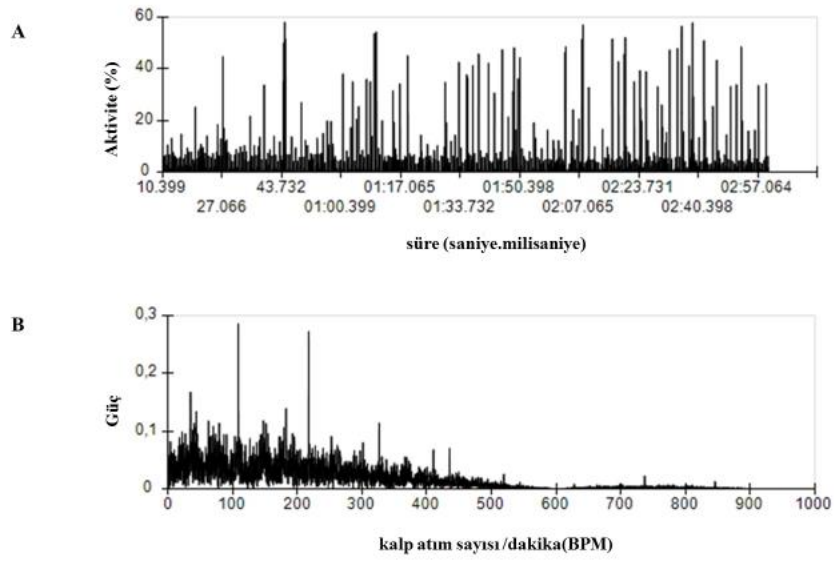


Şekil 4.56. N-butanol'ün farklı dozlarına bağlı olarak zebra balığı larvalarının kalp atım sayısındaki değişimler

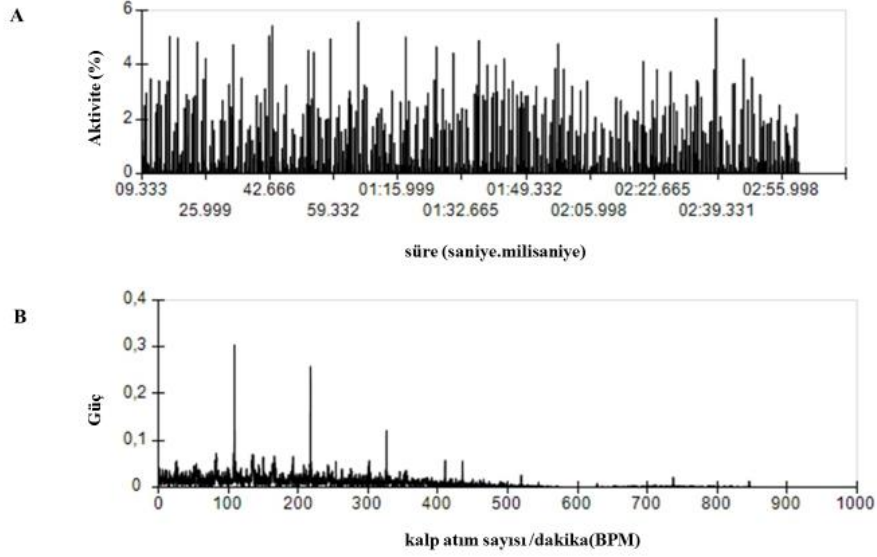
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak hesaplanmış olup deneme 4 tekrar olarak yapılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır. (n=4, her grup için 40 yumurta)



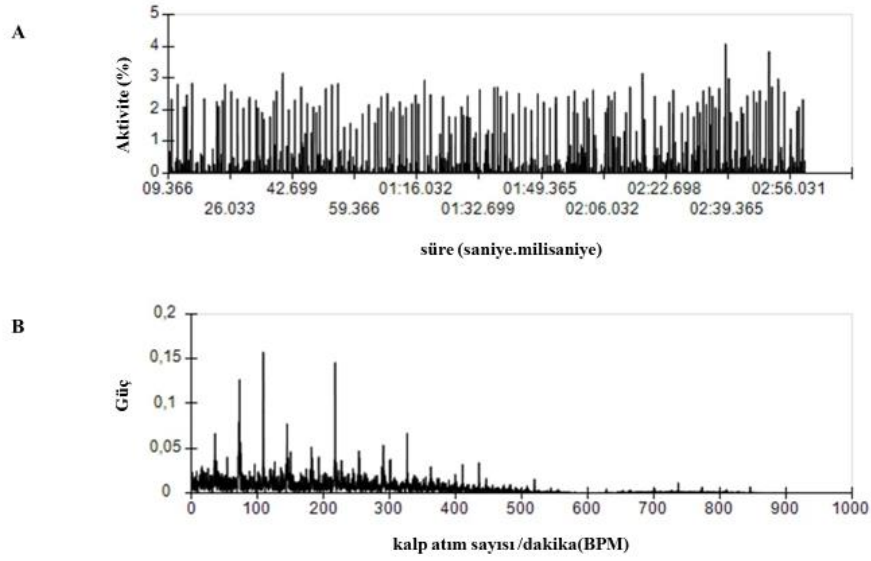
Şekil 4.57. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki kontrol grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B)



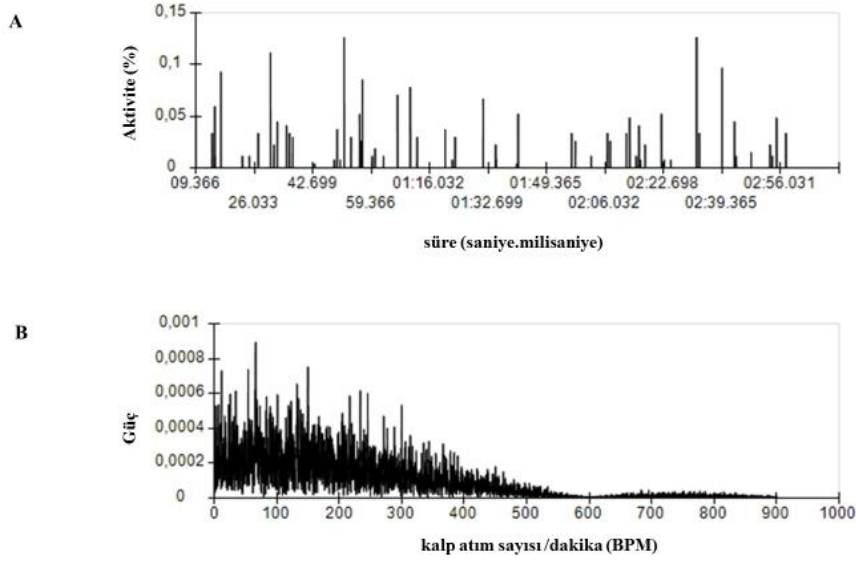
Şekil 4.58. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 10 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B)



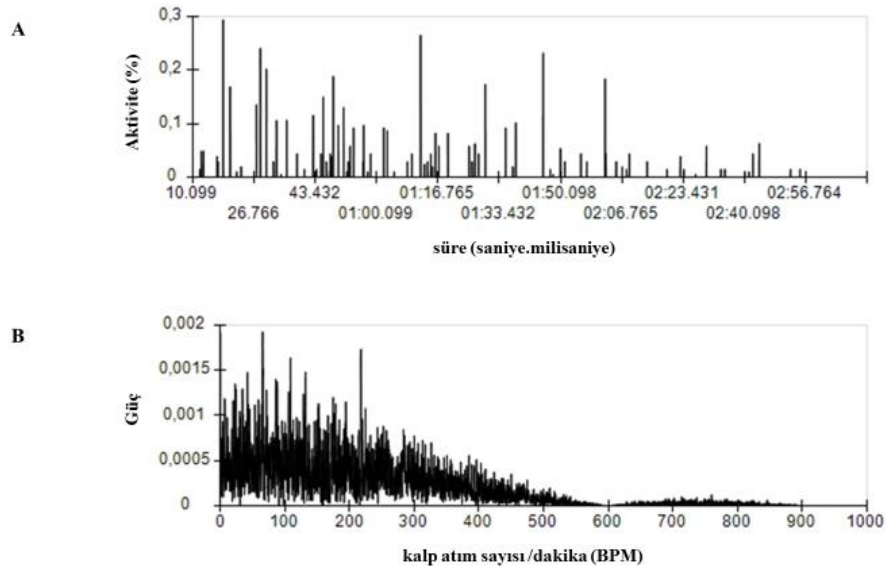
Şekil 4.59. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 250 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B)



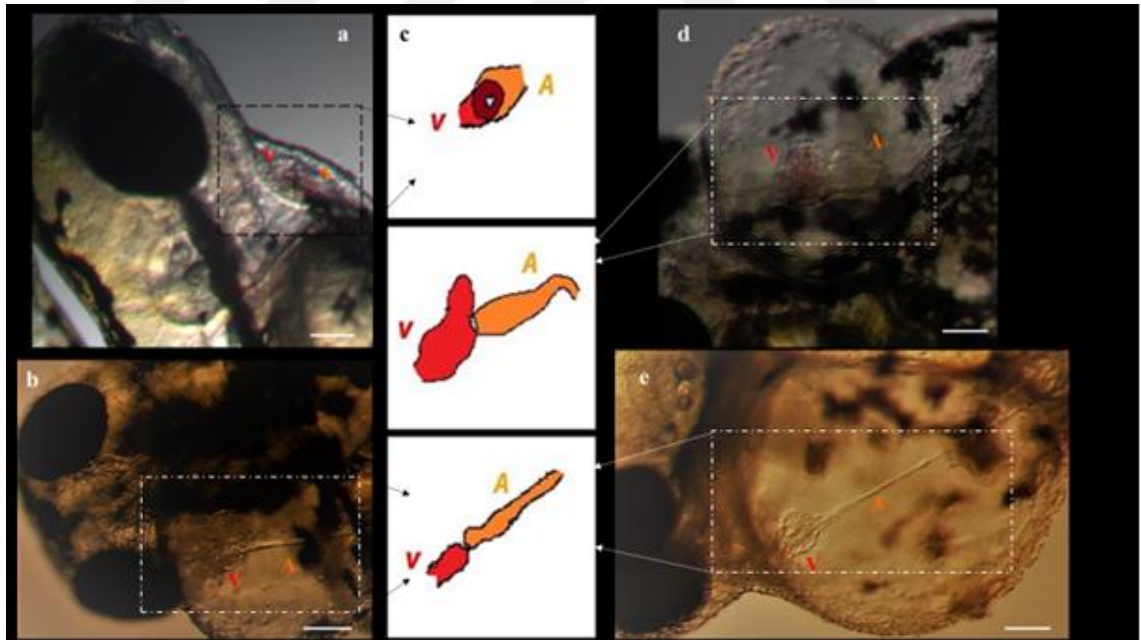
Şekil 4.60. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 500 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B)



Şekil 4.61. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 750 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B)



Şekil 4.62. Fertilizasyondan sonraki 96. saatteki 1000 mg/L n-butanol uygulama grubuna ait zebra balığı larvası kalp aktivitesi (A) ve kalp kasılma gücü (B).

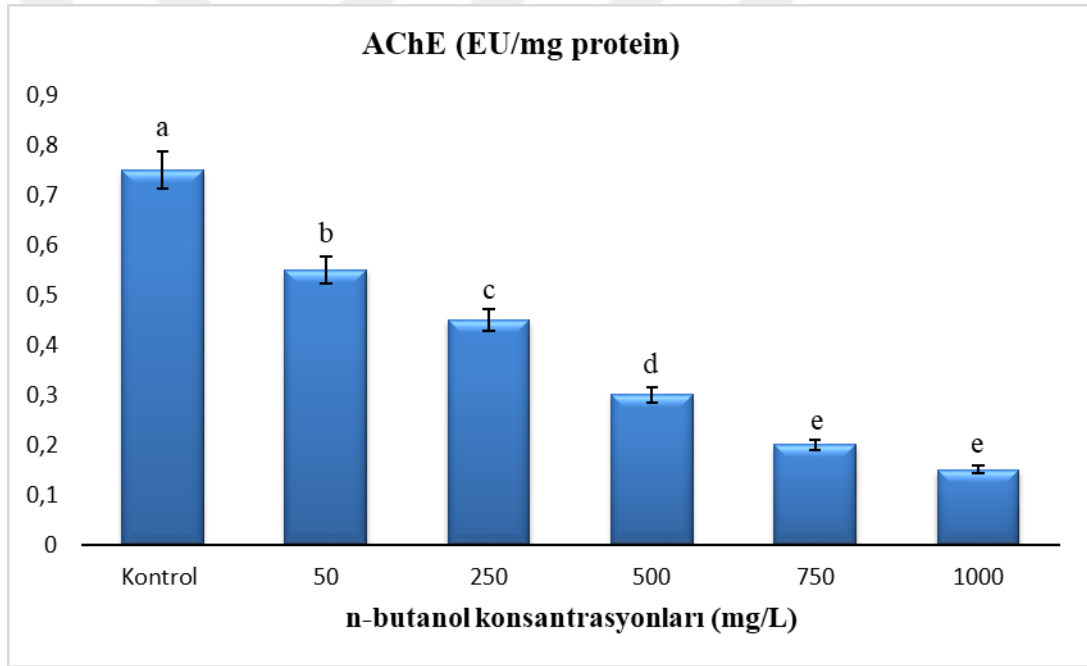


Şekil 4.63. Fertilizasyondan sonra 96. saatteki zebra balığı larvalarında n-butanol'ün kalp morfolojisi üzerine etkileri

a) kontrol grubu, b) 250 mg/L n-butanol uygulaması sonrası atriyumun incelmesi, c) Ibrahim *et al.* 2014, alkol (etanol) etkisi ile kontrol, ventrikül genişlemesi, atriyum incelmesi, atriyum ve ventrikül sınırının ayrılması, d) 500 mg/L n-butanol uygulaması sonrası ventrikül genişlemesi, e) 1000 mg/L n-butanol uygulaması sonrası atriyum incelmesi. Skala: 600 μ m

4.10. Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi

Zebra balığı embriyolarına n-butanol uygulaması (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) sonrasında 96. saatte tüm vücuttaki asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesinin kontrol ile karşılaştırıldığında uygulama gruplarındaki n-butanol'ün belirgin bir düşüşe neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Kontrol ile karşılaştırıldığında AChE enzim aktivitesindeki en belirgin düşüşün yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) olduğu görülmüş olup 750 ve 1000 mg/L uygulama grupları arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.64).



Şekil 4.64. Zebra balığı larvalarında 96. saatte n-butanol'ün farklı konsantrasyonlarının asetilkolinesteraz (AChE) enzim aktivitesi üzerine etkisi

Farklı harfler, gruplar arasındaki önemli farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$). Her bir değer, ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir ($n=4$, her grup için 100 yumurta)

4.11. Antioksidan Enzimlerin (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatiyon Peroksidaz) Aktivitesi ve Lipit Peroksidasyon (MDA) Düzeyi

N-Butanol konsantrasyonlarına (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) maruz kalan zebra balığı embriyolarında 96. saatte tüm vücuttaki lipit peroksidasyon (MDA) seviyeleri,

kontrol grubundakinden ($p < 0,05$) anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca n-butanol konsantrasyonlarına (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında tüm vücutta antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT ve GPx) de kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Çizelge 4.6). Ancak kontrol ile karşılaştırıldığında lipid peroksidasyon düzeyindeki en belirgin artışın 500 mg/L n-butanol uygulaması ve sonraki uygulama gruplarında olduğunu ve aynı şekilde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) antioksidan enzimlerdeki en belirgin azalmanın n-butanol'ün yüksek uygulama gruplarında (500, 750 ve 1000 mg/L) olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Zebra balığı larvalarında 96. saatte n-butanol'ün farklı konsantrasyonlarının antioksidan enzim aktivitesi ve MDA düzeyi üzerine etkileri.

Gruplar	MDA (nmol/ml protein)	SOD (EU/mg protein)	CAT (EU/mg protein)	GPx (EU/mg protein)
Kontrol	0,126±0,14 ^c	0,123±0,016 ^a	0,613±0,018 ^a	0,064±0,03 ^a
50 mg/L	0,662±0,14 ^b	0,092±0,016 ^{ab}	0,415±0,018 ^b	0,018±0,03 ^b
250 mg/L	0,641±0,14 ^b	0,049±0,016 ^{bc}	0,262±0,018 ^c	0,015±0,03 ^b
500 mg/L	0,823±0,14 ^{ab}	0,047±0,016 ^{bc}	0,205±0,018 ^d	0,011±0,03 ^{bc}
750 mg/L	0,876±0,14 ^{ab}	0,040±0,016 ^c	0,171±0,018 ^d	0,006±0,03 ^c
1000 mg/L	1,236±0,14 ^a	0,037±0,016 ^c	0,012±0,018 ^e	0,006±0,03 ^c

Değerlerin her biri ortalama± standart hata olarak verilmiştir (n=4, her grup için 150 yumurta).

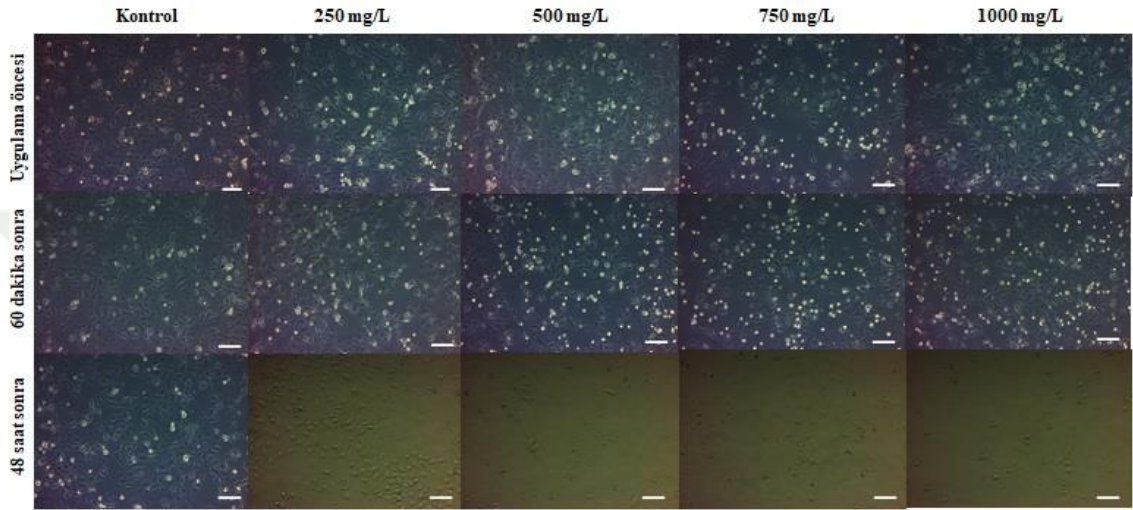
MDA: malondialdehit, SOD: süperoksit dismutaz, CAT: katalaz, GPx: glutatyon peroksidaz.

Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık vardır.

4.12. HUVEC (İnsan Umbilikal Damar / Vasküler Endotelium Hücreleri) Hücre Kültürü

Zebra balığı embriyolarına n-butanol uygulaması sonrasında kalp ve damarlar üzerine kimyasalın etkilerinin olduğu in vivo olarak belirlenmiştir. Kalp morfolojisindeki değişimler, kalp atış hızı değişimi, kalp aktivite oranı, kalp kasılma gücü ve kan

akışındaki değişimlerinin meydana geldiği n-butanol dozları in vitro olarak HUVEC hücre kültüründe denenmiş ve sonuçların in vivo etkileri desteklediği tespit edilmiştir. HUVEC hücre kültürüne uygulanan n-butanol etkisi sonucu endotel hücrelerde 60.dakikada ve 2. gün sonunda ölümler gözlenmiştir (Şekil 4.65).



Şekil 4.65. N-butanol'ün farklı dozlarının (0, 250, 500, 750 ve 1000mg/L) HUVEC hücre kültürü üzerine 60 dakika ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu sitotoksik etkisinin morfolojisinin mikroskop görüntüsü. Skala 25µm

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvanlarda kuluçka dönemi, gelişmekte olan embriyonun serbest yaşayan bir canlıya (larva) dönüşümünü belirtmektedir. Bu süreç birçok iç kaynaklı (endojen) ve çevresel faktör tarafından hassas bir şekilde ayarlanmıştır ve çeşitli kimyasal maddelere duyarlı olduğu gösterilmiştir. Larva çıkış oranı (kuluçka periyodu) farklı etkenlerin, balıklardaki ve diğer sucul hayvanlardaki erken gelişim ve üreme yetenekleri üzerine etkilerini belirlemek için biyolojik analizlerde genel olarak değerlendirilmektedir. Balıklarda koryonun parçalanması, gelişmekte olan larvanın spontan hareketlerine eşlik eden kuluçka salgı bezi hücrelerinin (HGC) perivitellin alanına (PVS) çıkartılması yoluyla koryolizin enziminin salgılanmasıyla sağlanır (De la Paz *et al.* 2017). Bazı çalışmalar alkol (etanol)'ün zebra balığı embriyolarının koryondan çıkış oranını azalttığı ve bir müddet sonra çıkışı tamamen durduğunu göstermiştir (Sylvain *et al.* 2010). Çalışmamızda morfolojik değişikliklerle korelasyon gösteren, n-butanol'ün yüksek dozlarına (750, 1000 ve 1250 mg/L) maruziyeti ile larva çıkışının güçlü bir şekilde inhibe edildiği gözlenmiştir. Sonuç olarak n-butanol'ün yüksek dozlarının kuluçka salgı bezi hücrelerini azaltarak bu hücreler tarafından salgılanan koryolizin enziminin salınımını azalttığı söylenebilir.

Skolyoz, fizyolojik veya anatomik eksiklerin gözlemlenmesi ile ortaya çıkan üç boyutlu omurga eğriliği ile karakterize edilen kompleks genetik bir bozukluktur. Skolyozun doğuştan ve nöromusküler formları, merkezi sinir sistemi ve kaslardaki hasarlar veya omurdaki kusurlu oluşumdan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Ancak skolyozun biyolojik nedeni şimdiye kadar bilinmemektedir (Cheng *et al.* 2015). Son genetik çalışmalarda, zebra balığı modelleri skolyozun genetik nedenlerine ışık tutma noktasında önemli sonuçlar sunmuştur. Skolyoz oluşumuna neden olabilecek bir etkenin beyinde bulunan serebrospinal sıvının akış dengesinin bu durumu düzenleyen silli hücrelerin hareketlerinin olduğu düşünülür. Serebrospinal sıvı açık berrak su görünümünde olup beyin ve omuriliği saran beyin ventrikülüsünde bulunur. Enfeksiyöz, toksik, metabolik ve tümöral hastalıkların incelenmesinde kullanılan bir sıvıdır. Siller mikrotübül kaynaklı organellerdir. Bu organeller hücre dışı alanları korumada, çevresel

sinyallerin birleştirilmesi ve algılanmasında kritik role sahiptir. Çoğu hücre tipi kısa sillerle donatılmasına rağmen uzun ve hareketli siller özelleşmiş hücrelerin yüzeyinde mevcuttur ve bazı durumlarda hücre dışı sıvı akış yönünü belirler. Siller embriyonik düzenleyiciler ile gelişimde embriyonun sağ-sol simetrisini ve merkezi sinir sisteminin homeostazisi için kritik öneme sahip serebrospinal sıvı akışını bozar ve bu bozulma birçok anormaliteye neden olur (Singla and Reiter 2006; Goetz and Anderson 2010; Lee 2013; Cheng *et al.* 2015; Simon and Iliff 2016).

Bir diğer önemli omurga deformasyonu olan lordoz omurganın bel ve boyun bölgelerinin içe lordotik eğriliğini ifade eder. Beynin bazı bölgeleri özellikle alt orta hipotalamus merkezi lordozun oluşumunda önemli olduğu bilinir. Lordozun oluşmasında alt orta hipotalamusun etkinliği östrojen ile bağlantılıdır (Daniels and Flanagan-Cato 2000; Kercmar *et al.* 2014). Yapmış olduğumuz çalışmada n-butanol'ün zebra balığı embriyolarında skolyoz ve lordoz gibi omurga deformasyonu ile sonuçlanan teratojenik etkilere neden olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle yüksek n-butanol uygulama gruplarında (500, 750 ve 1000 mg/L) zebra balıklarında skolyoz ve lordoz oluşumunun yüksek oranlarda olduğu belirlenmiştir. Çalışmamız n-butanol'ün kan-beyin bariyerini geçerek beyinde bazı bölgeleri etkilemesi ve bunun sonucunda da skolyoz ve lordoz gibi çoğunlukla beyin dokusunun etkilenmesi ile oluşabilecek malformasyonlara neden olduğunu göstermiştir.

Zebra balığı embriyolarında kalbin yapısı gelişim boyunca değişirken, gelişme ile aynı dönemde kalp atış hızında da küçük ancak istikrarlı bir artış olur. Li *et al.* (2016) alkol (etanol)'ün zebra balığı embriyolarında 30, 54 ve 78. saatte kalp atım sayısının ciddi oranda azalttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda n-butanol uygulamasında sonra embriyolarda 48, 72 ve 96. saatlerdeki ortalama kalp atım sayıları kontrol grubunda 112 ± 11 kalp atım sayısı/dakika, 10 mg/L 109 ± 8 kalp atım sayısı/dakika, 250 mg/L 98 ± 10 kalp atım sayısı/dakika, 500 mg/L 102 ± 6 kalp atım sayısı/dakika, 750 mg/L 96 ± 9 kalp atım sayısı/dakika, 1000 mg/L 88 ± 14 kalp atım sayısı/dakika olarak tespit edilmiştir. Zebra balığı embriyolarında n-butanol'ün doza bağlı olarak kalp atım sayısında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda kontrol

gruplarında kalp atım hızı dakikada 120-160 arasında olduğunu bildirmiştir (Bilotta *et al.* 2004; Antkiewicz *et al.* 2006; Kopp *et al.* 2010; Matrone *et al.* 2015). Çalışmamızda n-butanol uygulaması sonrası zebra balığı embriyolarında kalp atım hızı, oda sıcaklığında 23°C'de analiz edilmiştir ve kalp atım hızının sıcaklığa bağlı artış gösterdiği bulunmuştur. Bundan dolayı zebra balığı embriyoları için optimum sıcaklık değeri olan 28°C'de analiz edilen kalp atım sayılarına ait literatürlerle (De Luca *et al.* 2014) kıyaslandığında çalışmamızdaki kalp atım sayısı değerlerinin daha düşük oranda bulunması beklenen bir durumdur.

Kalp ve vasküler sistem alkolün zararlı etkilerine karşı duyarlıdır. Alkol, vücutta yaygın difüzyona uğrayan çoklu eşzamanlı ve sinerjik etkilere neden olan aktif bir toksindir. Alkol tüketimi miyokardik kasılmayı azaltır. Ayrıca kardiyak aritmileri (düzensiz kalp atışı) ve dilate kardiyomiyopatiyi (ventrikülün genişlemesi) indükleyerek ilerleyen kardiyovasküler fonksiyon bozukluğu ve yapısal hasara neden olur. Aşırı dozlarda veya artarak devam eden dozlarda alkol tüketimi kardiyovasküler sistem için zararlıdır. Alkol kardiyovasküler mortalite, koroner ve periferik arter hastalığı, kalp yetmezliği, kalp krizi riski, hipertansiyon, dislipidemi (kanda aşırı oranda yağ bulunması) ve şeker hastalığı oranını arttırdığı belirlenmiştir (Fernández-Solà 2015). Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında n-butanol uygulaması sonrası kalp morfolojisindeki değişimler kontrol ile karşılaştırıldığında bazı dozlardaki (250, 500, 750 ve 1000 mg/L) kardiyak ödemli embriyolarda 96. saatte kalbin atriyum bölgesinde miyokard kasılmasının azalması ile kalp kasının zayıflamasına bağlı incelme, ventrikül bölgesinde kan damarlarındaki endotel hücrelerin n-butanol etkisi ile ölmesi ve kan damarları iç basıncının azalması ile kanın yeterince pompalanamaması sonucu ventrikülün genişlemesi ve bu bölgede kan toplanması gözlemlenmiştir. Sonuçlarımız yukarıdaki bulgularla uyumludur.

Alkol ile ilgili çalışmalarda hedef organ olarak beyin seçilme sebebi reaktif oksijen türlerine karşı yüksek duyarlılığa sahip olması, vücudun toplam oksijeninin yaklaşık %20'sini tüketmesi ve çoklu doymamış yağ asitlerinin zengin olması ayrıca diğer dokulara kıyaslandığında endojen antioksidan düzeylerinin daha düşük olmasıdır

(Abreu *et al.* 2011). Beyin ve omurilikteki dejenerasyonlar, beyin ve omuriliğin temel hücreleri olan ganglion hücrelerinin şişip vakuollenmesi, sitoplazmadaki Nissl cisimciklerinin parçalanıp erimesi (demyelinizasyon), çekirdek büzüşmesi ve sonuç olarak eriyip gitmesi ile karakterizedir. Çalışmamızda n-butanol uygulaması sonrası kontrol ile karşılaştırıldığında zebra balığı embriyolarının 96. saatteki beyin histopatoloji örneklerinde yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) vakuol oluşumu belirlenmiştir. Ayrıca aynı dozlarda beyin bölgesinde hücre zarını geçebilen reaktif oksijen türleri indikatörü CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester)'nin floresan ışıma vermesi beyin bölgesinde reaktif oksijen türlerinin artışı göstermiş olup histopatolojik bulgularımızı desteklemiştir. Çalışmamızda beyin üzerine n-butanolün etkileri, skolyoz ve lordoz gibi çoğunlukla beyin bölgesinde oluşan etkiler sonucu olan malformasyonların n-butanol'ün uygulandığı dozlarda doza bağlı olarak bu anormalliklerin oranının artması da diğer beyin ile ilgili bulguları desteklediği görülmüştür.

Reaktif oksijen türlerine karşı özel bir savunma mekanizmasına sahip olan ve alkoller, alkol dehidrojenaz, aldehid dehidrojenaz ve sitokrom enzimleri vasıtasıyla metabolize eden ana organ olan karaciğer, diğer hedef organ olarak seçilmiştir. Aşırı miktarda alkole maruz kalan karaciğer, oksidatif stresin ve iltihaplanma gibi değişime uğrar (Ilaiyaraja and Khanum 2011; Cichoż-Lach and Michalak 2014). Çalışmamızda n-butanol uygulanan gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında karaciğer histopatolojik bulgular n-butanolün yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) şişkin vakuol şeklinde hepatosit ve nekroza uğramış hepatositlerin olduğu tespit edilmiştir. Bu durum reaktif oksijen türleri indikatörü CM-H2DCFDA (5-krometil-2', 7'-diklorodihidrofloresan diasetat asetil ester)'nin yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000mg/L) karaciğer bölgesinde floresan ışıma vermesi ile de desteklenmiştir.

Zebra balığı modeli kullanarak, hücre ölümü tüm embriyoda incelenebilir. Canlı embriyolarda, Akridin Oranj boyama yöntemi kullanılarak hücre ölümü tespit edilebilir. Otofaji, alkol kaynaklı doku hasarına karşı hücresel bir koruyucu mekanizma olarak hizmet eder, ancak aşırı otofaji de apoptosise yol açarak zararlı olabilir (Potz *et al.*

2016). Doğum öncesi alkol kullanımı sonucu insan ve fare beyin kortikol mikrodamarlarında otofajik vakuol sayısının attığı daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Girault *et al.* 2017). Çalışmamızda n-butanol uygulama gruplarında (500, 750 ve 1000 mg/L) zebra balığı embriyolarında 96. saatteki beyin histopatolojisindeki vakuol oluşumları ve baş bölgesinde Akridin Oranj ile yapılan boyama sonrası apoptotik hücre ölümünde önemli artışlara neden olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak n-butanol'ün etkisi ile beyin hücrelerinde aşırı otofajiye neden olarak apoptoz yolağını aktive ettiğini belirtebiliriz. Ayrıca bazı çalışmalar alkol (etanol) kaynaklı oksidatif stresin sinir sisteminde hücre ölümüne yol açtığını öne sürmüştür. Embriyolar oksidatif strese karşı daha duyarlıdır. Çünkü yetişkin dokuları ile embriyoların ki karşılaştırıldığında antioksidan sistemler (katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz) embriyolarda daha az aktiftir (Gerdin *et al.* 1985; Mariucci *et al.* 1999; Henderson *et al.* 1999; Reimers *et al.* 2006). Çalışmamızda zebra balığı embriyolarında n-butanol uygulaması sonrası n-butanol'ün yüksek dozlarında (500, 750 ve 1000mg/L) reaktif oksijen türleri indikatörü CM-H2DCFDA boyaması sonucu beyin ve karaciğer bölgelerindeki ROS miktarındaki artışa bağlı ışımaya artışına dayanarak reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarakta apoptozisin indüklendiğini söyleyebiliriz.

Alkole maruz kalmış embriyolarda siklopi (tek göz oluşumu) gibi malformasyon gözlemlenir. Siklop embriyolar, görme sistemindeki fizyolojik ve morfolojik kusurlar olan kaynaşmış gözlere ve beyin ventral spesifikasyonu eksikliğine sahip olup bu malformasyon teratoloji ve nörotoksisite değerlendirmeleri için yararlı bir model sağlar (Santos-Ledo *et al.* 2011). Çalışmamızda n-butanol uyguladığımız embriyolarda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde göz morfolojisi incelemesi sonucunda 500 mg/L uygulama dozundan sonra embriyolarda siklopi gözlemlenmiştir. Bu bulgularımız daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Örneğin, alkol maruziyetinden hemen sonra göz boyutunun önemli ölçüde azalma olduğu ve bu mikroftalmi (küçük göz) durumunun larva gelişimi boyunca devam ettiğini bildirmiştir (Reimers *et al.* 2004; Dlugos and Rabin 2007; Kashyap *et al.* 2007; Ali *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011). Çalışmamızda n-butanol doz uygulaması sonrasında 24, 48, 72 ve 96. saatlerde zebra

balığı embriyolarında yapılan göz ölçümleri sonucunda 250, 500, 750 ve 1000 mg/L n-butanol uygulamalarında küçük göz oluşumu (mikroftalmi) oranı doza bağlı olarak artış göstermekle birlikte kontrol ile farklılık da tespit edilmiştir.

Ayrıca kontrol grubu göz boyutu zamana bağlı olarak artarken yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) göz boyutunda artış olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile n-butanol'ün göz gelişimi üzerine olumsuz etkileri saptanmış olup bu durumun kimyasalın embriyonun göz gelişimi için önemli olan ön beyin bölgesini etkilediği söylenebilir.

Mitokondrial fonksiyon bozuklukları, kalp, karaciğer, böbrek, gastrointestinal sistem, göz, santral ve periferik sinir sistemi, kas, iskelet sistemi gibi pek çok yapıyı etkilemektedir ve tıbbın tüm alanlarını ilgilendirmektedir (Chinnery and Turnbull 1999). Beyin ve kas aerobik ihtiyaçları en fazla organlar olduğundan mitokondrial hastalıklar en sık nörolojik bozukluklar ile karşımıza çıkar (Nissenkorn *et al.* 2000). Mitokondrial fonksiyon bozuklukları özellikle çocuklarda kardiyomiyopatiye neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca beynin yoğun spongi (süngerimsi) dejenerasyonu ve konjestif kardiyomiyopati gibi bozukluklarda mitokondrial fonksiyon bozukluğunu sonucunda meydana geldiği bilinir. Mitokondrial hastalıklarda ölüm nedenleri hakkında bilgi sınırlıdır. (Drachman 1968; Anan *et al.* 1995; Koç 2004). Çalışmamızda n-butanol'ün yüksek dozlarında (500, 750 ve 1000 mg/L) beyinde vakuol oluşturmaları (spongi dejenerasyonu) ve aynı dozlarda kalp kasındaki zayıflamaya bağlı olarak kalp atış hızının azalması, gözlerdeki etkileri ile lordoz ve skolyoz gibi iskelet deformasyonları bulgularına dayanarak n-butanol'ün mitokondrial hastalıklarda neden olabileceği söylenebilir.

Son zamanlarda insanlarda 4- (4-hidroksifenil) -2-butanol (HPB) maruziyetinden kaynaklanan deri bozulmaları rapor edilmiştir. Bununla birlikte, HPB'nin neden olduğu bu deri pigmentasyon bozukluklarındaki rolü tam olarak açık değildir (Fukuda *et al.* 1998; Kuroda *et al.* 2014; Kasamatsu *et al.* 2014; Tokura *et al.* 2015; Kondo *et al.* 2016). Çalışmamızda zebra balığı embriyolarına uygulanan n-butanol dozlarının (10,

50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) tümünde 72. saatten sonra kimyasalın deri üzerine etkilerini teratojenik bulgulardaki zayıf pigmentasyon oluşumu ile belirlenmiştir. Ayrıca n-butanol uygulanmış embriyolarda Akridin Oranj boyama yöntemi ile 96. saatte deride apoptotik hücrelerin artması ile teratojenik bulgular desteklenmiştir.

Asetilkolinesteraz (AChE), merkezi ve periferik sinir sistemlerinde sayısız kolinerjik yolakta nörotransmitter asetilkolinin hızlı hidrolizi ile impuls iletiminin sona ermesinde sorumludur (Lazarevic-Pasti *et al.* 2017). Alkol uygulaması, merkezi sinir sistemi üzerinde çeşitli etkilere sahiptir. Bazı model organizmalarda yapılan çalışmalarda kronik alkol uygulamalarında alkolün asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini azalttığını tespit edilmiştir (Hardy *et al.* 1985; Arendt *et al.* 1988; Arendt *et al.* 1989; Phunchago *et al.* 2015). Çalışmamızda n-butanol uygulaması sonrasında zebra balığı embriyolarında 96. saatte tüm uygulama gruplarında (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin azaldığı belirlenmiş ve en yüksek düşüşün yüksek uygulama gruplarında (500, 750 ve 1000 mg/L) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Sun *et al.* (2017) yapmış oldukları çalışmada akut alkol (etanol) uygulama sonucu hem in vivo hem in vitro olarak AChE aktivitesinde artışın olduğunu ve bu değişimin de apoptozu tetiklediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda n-butanol'ün apoptozisi hem tüm vücutta hemde beyin bölgesinde tetiklediği tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak n-butanol'ün etkisi ile zebra balığı embriyolarında AChE aktivitesindeki azalışın vücuttaki AChE dengenin bozulmasına ve apoptoz yolağının değişimine bağlı olarak apoptotik hücrelerde artışa neden olduğu söylenebilir.

Normal koşullarda hücreler, hücre içi redoks durumu dengesinin korunabilmesi için süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1), katalaz (EC 1.11.16) ve glutatyon peroksidaz (GPx, EC 1.11.1.9) gibi enzimatik ve enzimatik olmayan bir takım antioksidatif sistemler tarafından korunmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin (süperoksit anyonları, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri) artışı kaynaklı olarak bu antioksidan sistemlerin dengesinin bozulması ile oksidatif hasar, çeşitli patolojilerde hücre yaralanması ve ölümüne neden olan önemli patofizyolojik durumlar meydana gelebilir. Ayrıca bu reaktif türler, membran lipidlerinde oksidatif hasara ve lipid peroksidasyon

(MDA) seviyesinde değişimlere neden olurlar (Kabuto *et al.* 2003; Yao *et al.* 2006). Bazı alışmalar alkol uygulaması sonucunda antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT ve GPx) azalma ve lipid peroksidasyon seviyesinde ise artış olduğunu bildirmişlerdir (Sun and Sun 2001; Hernández *et al.* 2016; Chen *et al.* 2016; Müller *et al.* 2017; Wang *et al.* 2017). Çalışmamızda zebra balığı embriyolarına n-butanol uygulaması (50, 250, 500, 750 ve 1000 mg/L) sonrası 96. saatteki antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT ve GPx) doza bağlı olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalış ve lipid peroksidasyon seviyesinde ise artış olduğu belirlenmiştir. Özellikle yüksek n-butanol doz uygulamalarında (500, 750 ve 1000 mg/L) süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz enzim aktivitelerinde ciddi oranda azalma, lipid peroksidasyon seviyesinde ise artış tespit edilmiştir. Ayrıca n-butanol'ün yüksek uygulama dozlarında (500, 750 ve 1000 mg/L) zebra balığı embriyolarında 96. saatteki karaciğer histopatoloji sonuçlarındaki vakuol ve nekroz oluşumunun nedenlerinden birinde antioksidan enzimlerin azalma ve lipid peroksidasyon seviyesindeki yükselme kaynaklı olabileceği düşünölmüştür.

Embriyogenez sırasında kan damarları anjiyogenez yoluyla oluşur. Anjiyogenez, mevcut kan damarlarından yeni kan damarları oluşumundan sorumlu olan bir fizyolojik süreçtir. Endotel hücreler, çoğalma, göç ve birleştirme gibi çeşitli mekanizmalarla bu sürece katılırlar (Polverini *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2017). Anjiyogenez, büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi gibi süreçlerde olması beklenen bir olay olmasının yanı sıra bazı durumlarda patolojik de olabilmektedir. Anjiyogenezi arttıran ve azaltan faktörler anjiyogenezin normal oluşum dengesini bozarak anjiogenez oluşumunda anormalliklerin görölmesine neden olabilir (Geudens and Gerhardt 2011; Herbert and Stainier 2011). Kan damarları, endotel hücrelerin şekil değiştirmesi ve hücreler arası bağlantılar ile tüp şeklinde bir yapıya dönüşürler (Betz *et al.* 2016). Kan damarları, doku veya organ büyümesi sırasında ya şekillerini muhafaza ederek kalır veya yeniden şekillenebilirler (Hahn and Schwartz 2009; Freund *et al.* 2012). Endotel hücrelerin kan akışına verdiği yanıtlar, damar içi homeostazisinin korunması (vasküler geçirgenlik ve kan basıncı) için gereklidir. (Hahn and Schwartz 2009; Chiu and Chien 2011; Ando and Yamamoto 2013). Çalışmamızda zebra balıklarının embriyoları üzerine n-butanol'ün

teratojenik etkilerine bakıldığında en yüksek oranda belirlenen malformasyonun kardiyak ödem olduğu tespit edilmiştir. N-Butanol'ün yüksek dozlarında (500, 750 ve 1000 mg/L) kardiyak ödemli embriyoların 96. saatte kuyruk vena ve arter damarlarında dolaşımın olmadığı gözlemlenmiş olup böylece damarlardaki endotel hücrelerin n-butanol ile etkilendiği ve kardiyak ödeme neden olduğu tahmin edilmektedir. İn vivo olarak zebra balıklarında n-butanol'ün kalp-damar sistemi üzerine etkisinin belirlendiği dozlar (kontrol, 250, 500, 750 ve 1000) in vitro olarak da HUVEC hücre kültürü üzerine etkisi ile desteklenmiştir. HUVEC hücre kültürüne uygulanan 250 mg/L n-butanol 2. günde hücrelerin %50 sini öldürdüğü, yüksek dozlarda (500, 750 ve 1000 mg/L) ise hücre kültürünün tamamının öldüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca n-butanol'ün yüksek dozlarında (500, 750 ve 1000 mg/L) kalp morfolojisindeki anormallikler, kalp atış hızı, kalp atım gücü ve kalp aktivitesi parametrelerindeki azalma, kan dolaşımının durması gibi etkiler kalp kasının zayıflaması ile damar içerisinde kan basıncının yeterli olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak n-butanol'ün zebra balığı embriyoları üzerine ciddi teratojenik, nörotoksik ve kardiyotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. N-Butanol maddesi gıdada alanındaki artan kullanımı ile insan sağlığı için büyük tehlike oluşturacağı düşünülmektedir. Zebra balığının insan kaynaklı araştırmalar için uygunluğu bu çalışma ile bir kez daha ortaya konulmuştur. Ayrıca n-butanol kullanımının artışına bağlı olarak doğaya da fermantasyon ara ürünü olarak (peynir altı suyu atıkları) ulaşabileceği, sucul organizmalar için tehlike oluşturabileceği düşünülmeli ve önlem alınmalıdır.

KAYNAKLAR

- Abreu, R.V., Silva-Oliveira, E.M., Moraes, M.F.D., Pereira, G.S. and Moraes-Santos, T., 2011. Chronic coffee and caffeine ingestion effects on the cognitive function and antioxidant system of rat brains. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 99(4), 659-664.
- Aebi, H., 1974. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, pp. 673-678.
- Ahlgren, S.C., Thakur, V. and Bronner-Fraser, M., 2002. Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10476-10481.
- Ali, S., Champagne, D.L., Alia, A. and Richardson, M.K., 2011. Large-scale analysis of acute ethanol exposure in zebrafish development: a critical time window and resilience. *PloS one*, 6(5), e20037.
- Amali, A.A., Rekha, R.D., Lin, C.J.F., Wang, W.L., Gong, H.Y., Her, G.M. and Wu, J.L., 2006. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis. *Journal of biomedical science*, 13(2), 225-232.
- Anan, R., Nakagawa, M., Miyata, M., Higuchi, I., Nakao, S., Suehara, M., Osame, M. and Tanaka, H., 1995. Cardiac involvement in mitochondrial diseases. *Circulation*, 91(4), 955-961.
- Ando, J. and Yamamoto, K., 2013. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovascular research*, 99(2), 260-268.
- Antkiewicz, D.S., Peterson, R.E., and Heideman, W., 2006. Blocking expression of AHR2 and ARNT1 in zebrafish larvae protects against cardiac toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicological Sciences*, 94: 175–182.
- Arendt, T., Hennig, D., Gray, J. A. and Marchbanks, R., 1988. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain research bulletin*, 21(4), 563-569.
- Arendt, T., Allen, Y., Marchbanks, R. M., Schugens, M. M., Sinden, J., Lantos, P. L. and Gray, J. A., 1989. Cholinergic system and memory in the rat: effects of chronic ethanol, embryonic basal forebrain brain transplants and excitotoxic lesions of cholinergic basal forebrain projection system. *Neuroscience*, 33(3), 435-462.
- Arenzana, F.J., Carvan, M.J., Aijon, J., Sanchez-Gonzalez, R., Arevalo, R. and Porteros, A., 2006. Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicology and teratology*, 28(3), 342-348.
- Atabeyoğlu, K., 2011. Bazı ağır metallerin subletal dozlarının gökkuşağı alabalıklarında, katalaz, superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz enzim aktiviteleri ve mRNA ekspresyonları üzerine etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Su ürünleri mühendisliği Anabilim Dalı. Doktora Tezi.
- Aust, S.D., 1994. Thiobarbituric acid assay reactants. *Meth. Toxicol*, 367-374.
- Bailey, J.M., Oliveri, A.N., Zhang, C., Frazier, J.M., Mackinnon, S., Cole, G.J. and Levin, E.D., 2015. Long-term behavioral impairment following acute embryonic ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 48, 1-8.

- Baker, K., Holtzman, N.G. and Burdine, R.D., 2008. Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(37), 13924-13929.
- Bale, A.S., and Lee, J.S., 2016. An overview of butanol-induced developmental neurotoxicity and the potential mechanisms related to these observed effects. *Neurotoxicology and teratology*, 53, 33-40.
- Bang, A., Grønkjær, P. and Malte, H., 2004. Individual variation in the rate of oxygen consumption by zebrafish embryos. *Journal of Fish Biology*, 64(5), 1285-1296.
- Bengtsson, B.E., Renberg, L. and Tarkpea, M., 1984. Molecular Structure and Aquatic Toxicity – an Example with C1-C13 Aliphatic Alcohols. *Chemosphere* 13(5-6):613-622.
- Bessa, J., Tavares, M.J., Santos, J., Kikuta, H., Laplante, M., Becker, T.S., Gómez-Skarmeta, J. L. and Casares, F., 2008. *meis1* regulates cyclin D1 and c-myc expression, and controls the proliferation of the multipotent cells in the early developing zebrafish eye, *Development* 135, 799-803.
- Betz, C., Lenard, A., Belting, H. G. and Affolter, M., 2016. Cell behaviors and Dynamics during angiogenesis. *Development*, 143(13), 2249-2260.
- Beutler, E., 1984. *A manual of biochemical methods*, 3rd edn., Grune and Stratton, New York San Francisco London.
- Bikfalvi, I. and Pasztor, L., 1977. Study on the Components Distillates of Wine Using Gas Chromatography. *Szeszpar*, 25: 96-100. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*. WHO.
- Bilotta, J., Barnett, J.A., Hancock, L. and Saszik, S., 2004. Ethanol exposure alters zebrafish development: a novel model of fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 737-743.
- Binder, V. and Zon, L.I., 2013. High throughput in vivo phenotyping: The zebrafish as tool for drug discovery for hematopoietic stem cells and cancer. *Drug Discov. Today Dis. Models* 10, 17-22.
- Bitgood, M.J. and McMahon, A.P., 1995. *Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell-Cell Interaction in the Mouse Embryo*. *Developmental biology*, 172(1), 126-138.
- Bonte, W., 1978. Congener Content of Wine and Similar Beverages. *Blutalkohol*, 15: 392-404. As cited in WHO. 1987. *World Health Organization. Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*.
- Bonte, W., 1979. Congener Substances in German and Foreign Beers. *Blutalkohol*, 16: 108-124. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*. WHO.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V. and Nagel, R., 1990. Hepatic steatosis in zebrafish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to γ -

- hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and environmental safety*, 19(3), 355-374.
- Bredensen, D.E., 1996 a. Keeping neurons alive: The molecular control of apoptosis (Part I), *The Neuroscientist* 2: 181-190.
- Bredensen, D.E., 1996 b. Keeping neurons alive: The molecular control of apoptosis (Part II), *The Neuroscientist* 2: 211-216.
- Bridie, A.L., Wolff, C.J.M. and Winter, M., 1979. The Acute Toxicity of some Petrochemicals to Goldfish. *Water Res* 13(7):623-626.
- Brown, D.R., Samsa, L.A., Qian, L. and Liu, J., 2016. Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. *Journal of cardiovascular development and disease*, 3(2), 13.
- Buske, C. and Gerlai, R., 2011. Early embryonic ethanol exposure impairs shoaling and the dopaminergic and serotonergic systems in adult zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 698-707.
- Bussmann, J., Bakkers, J. and Schulte-Merker, S., 2007. Early endocardial morphogenesis requires *Scl/Tal1*. *PLoS genetics*, 3(8), e140.
- Carney, S.A., Peterson, R.E., Heideman, W., 2004. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Mol Pharmacol*, 66:512-521.
- Cartwright, M.M., Tessmer, L.L. and Smith, S.M., 1998. Ethanol-Induced Neural Crest Apoptosis Is Coincident with Their Endogenous Death, But Is Mechanistically Distinct. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(1), 142-149.
- Carvan, M.J., Loucks, E., Weber, D.N. and Williams, F.E., 2004. Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicology and teratology*, 26(6), 757-768.
- CEH-SRI, 1999. Chemical Economics Handbook-SRI International, <https://www.ihs.com/products/chemical-economics-handbooks.html>.
- Chang, S.S., Peterson, K.J. and Ho, C., 1978. Chemical Reactions Involved in the Deep-Fat Frying of Foods. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 55: 718-727. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert- Butanol Isobutanol. WHO.
- Charness, M.E., Safran, R.M. and Perides, G., 1994. Ethanol inhibits neural cell-cell adhesion. *Journal of biological chemistry*, 269(12), 9304-9309.
- Charrier, J.B., Lapointe, F., Le Douarin, N.M. and Teillet, M.A., 2001. Anti-apoptotic role of Sonic hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development*, 128(20), 4011-4020.
- Chatterjee, D., Shams, S. and Gerlai, R., 2014. Chronic and acute alcohol administration induced neurochemical changes in the brain: comparison of distinct zebrafish populations. *Amino acids*, 46(4), 921-930.
- Chen, J.N., Van Eeden, F.J., Warren, K.S., Chin, A., Nusslein-Volhard, C., Haffter, P. and Fishman, M.C., 1997. Left-right pattern of cardiac BMP4 may drive asymmetry of the heart in zebrafish. *Development*, 124(21), 4373-4382.
- Chen, W.M., Shaw, L.H., Chang, P.J., Tung, S.Y., Chang, T.S., Shen, C.H., Hsieh, Y.Y. and Wei, K.L., 2016. Hepatoprotective effect of resveratrol against ethanol-induced oxidative stress through induction of superoxide dismutase in vivo and in vitro. *Experimental and therapeutic medicine*, 11(4), 1231-1238.

- Cheng, J.C., Castelein, R.M., Chu, W.C., Danielsson, A.J., Dobbs, M.B., Grivas, T.B., Gurnett, C.A., Luk, K.D., Moreau, A., Newton, P.O., Stokes, I.A., Weinstein, S.L., Burwell, R. G., 2015. Adolescent idiopathic scoliosis. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15030-15030.
- Chinnery, P.F. and Turnbull, D.M., 1997. Clinical features, investigation, and management of patients with defects of mitochondrial DNA. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 63(5): 559-563.
- Chiu, J.J. and Chien, S., 2011. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiological reviews*, 91(1), 327-387.
- Choi, D.W., 1996. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Current opinion in neurobiology*, 6(5), 667-672.
- Chrisman, K., Kenney, R., Comin, J., Thal, T., Suchocki, L., Yueh, Y.G. and Gardner, D.P., 2004. Gestational ethanol exposure disrupts the expression of FGF8 and Sonic hedgehog during limb patterning. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 70(4), 163-171.
- Cichoż-Lach, H. and Michalak, A., 2014. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World journal of gastroenterology: WJG*, 20(25), 8082.
- Comporti, M., Signorini, C., Leoncini, S., Gardi, C., Ciccoli, L., Giardini, A., Vecchio, D. and Arezzini, B., 2010. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes & nutrition*, 5(2), 101-109.
- Connor, T.H., Theiss, J.C., Hanna, H.A., Monteith, D. K. and Mathey, T. S., 1985. Genotoxicity of Organic Chemicals Frequently Found in the Air of Mobile Homes. *Toxicol. Lett.*, 25: 33-40. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*. WHO.
- Corbin, W.R., Farmer, N.M. and Nolen-Hoekesma, S., 2013. Relations among stress, coping strategies, coping motives, alcohol consumption and related problems: A mediated moderation model. *Addictive Behaviors*, 38(4), 1912-1919.
- Cudd, T.A., 2005. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp. Biol. Med.* 230, 389-393.
- Daniel, M.A. and Evans, M.A., 1982. Quantitative comparison of maternal ethanol and maternal tertiary butanol diet on postnatal development. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 222(2), 294-300.
- Daniels, D. and Flanagan-Cato, L.M., 2000. Functionally-defined compartments of the lordosis neural circuit in the ventromedial hypothalamus in female rats. *Journal of neurobiology*, 45(1), 1-13.
- Davis, J.M., 2002. *Basic Cell Culture*, 2nd edition; IRL, Oxford.
- De, A., Boyadjieva, N.I., Pastorcic, M., Reddy, B.V. and Sarkar, D.K., 1994. Cyclic AMP and ethanol interact to control apoptosis and differentiation in hypothalamic beta-endorphin neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 269(43), 26697-26705.
- De la Paz, J.F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M.S. and Allende, M.L., 2017. Triazole Fungicides Inhibit Zebrafish Hatching by Blocking the Secretory Function of Hatching Gland Cells. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 710.

- de La Pompa, J.L., Timmerman, L.A., Takimoto, H., Yoshida, H., Elia, A.J., Samper, E., Potter, J., Wakeham, A., Marengere, L., Langille, B.L., Crabtree, G.R. and Mak, T.W., 1998. Role of the NF-ATc transcription factor in morphogenesis of cardiac valves and septum. *Nature*, 392(6672), 182-186.
- De Luca, E., Zaccaria, G.M., Hadhoud, M., Rizzo, G., Ponzini, R., Morbiducci, U. and Santoro, M.M., 2014. ZebraBeat: a flexible platform for the analysis of the cardiac rate in zebrafish embryos. *Scientific reports*, 4: 4898.
- de Pater, E., Clijsters, L., Marques, S.R., Lin, Y.F., Garavito-Aguilar, Z.V., Yelon, D. and Bakkers, J., 2009. Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart. *Development*, 136(10), 1633-1641.
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. and Weinstein, B.M., 2009. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell*. 16, 209-221.
- Dick, D.M. and Bierut, L.J., 2006. The genetics of alcohol dependence. *Current psychiatry reports*, 8(2), 151-157.
- Dlugos, C.A. and Rabin, R.A., 2007. Ocular deficits associated with alcohol exposure during zebrafish development. *Journal of Comparative Neurology*, 502(4), 497-506.
- Dlugos, C.A. and Rabin, R.A., 2010. Structural and functional effects of developmental exposure to ethanol on the zebrafish heart. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34, 1013-1021.
- Doolittle, A.K., 1954. *The Technology of Solvents and Plasticizers*, New York: Wiley, pp.644-45, cited in Butanols: four isomers, Environmental Health Criteria monograph No.65, Geneva: World Health Organization, 1987, ISBN 92-4-154265-9.
- Dou, X., Menkari, C.E., Shanmugasundararaj, S., Miller, K. W. and Charness, M.E., 2011. Two alcohol binding residues interact across a domain interface of the L1 neural cell adhesion molecule and regulate cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18), 16131-16139.
- Drachman, D.A., 1968. Ophthalmoplegia plus: the neurodegenerative disorders associated with progressive external ophthalmoplegia. *Archives of Neurology*, 18(6), 654-674.
- Duan, J., Yu, Y., Shi, H., Tian, L., Guo, C., Huang, P., Zho, X., Peng, S. and Sun, Z., 2013. Toxic effects of silica nanoparticles on zebrafish embryos and larvae. *PloS one*, 8(9), e74606.
- Ducci, F. and Goldman, D., 2008. Genetic approaches to addiction: genes and alcohol. *Addiction*, 103(9), 1414-1428.
- Dumont, J.P. and Adda, J., 1978. Occurrence of Sesquiterpenes in Mountain Cheese Volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 26: 364-367. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol. WHO. ed. Grune and Starton, New York
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) 2003a. n-Butanol. JACC No. 41. ISSN-0773-6339-41.
- ECETOC (European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals) 2003b. sec-Butanol. JACC No. 43. ISSN-0773-6339-43.

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 881-905.
- Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirose, A. and Kamata, E., 2005. Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. *Food and chemical toxicology*, 43(2), 325-331.
- Engel, P. C. and Massey, V., 1971. Green butyryl-coenzyme A dehydrogenase. An enzyme-acyl-coenzyme A complex. *Biochemical Journal*, 125(3), 889-902.
- EPA, 2006. Chemical Data Reporting under the Toxic Substances Control Act, <http://www2.epa.gov/chemical-data-reporting>.
- EPA, 2010. Toxics Release Inventory (TRI) Program, <http://www2.epa.gov/toxics-release-inventory-tri-program/tri-data-and-tools>.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N. and Blaschek, H.P., 2005. Continuous butanol fermentation and feed starch retrogradation: butanol fermentation sustainability using *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of biotechnology*, 115(2), 179-187.
- Ezeji, T., Qureshi, N. and Blaschek, H.P., 2007. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnology and bioengineering*, 97(6), 1460-1469.
- Fan, C.M., Porter, J.A., Chiang, C., Chang, D. T., Beachy, P. A. and Tessier-Lavigne, M., 1995. Long-range sclerotome induction by sonic hedgehog: direct role of the amino-terminal cleavage product and modulation by the cyclic AMP signaling pathway. *Cell*, 81(3), 457-465.
- Fernandes, Y., Rampersad, M. and Gerlai, R., 2015. Embryonic alcohol exposure impairs the dopaminergic system and social behavioral responses in adult zebrafish. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(6).
- Fernández-Solà, J., 2015. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nature Reviews Cardiology*, 12(10), 576-587.
- Finney, D.J. and Stevens, W.L., 1948. A table for the calculation of working probits and weights in probit analysis. *Biometrika*, 35(1/2), 191-201.
- Freshney, R.I., 2000. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3rd edition; Wiley-Liss, New York.
- Freund, J.B., Goetz, J.G., Hill, K.L. and Vermot, J., 2012. Fluid flows and forces in development: functions, features and biophysical principles. *Development*, 139(7), 1229-1245.
- Fukuda, Y., Nagano, M. and Futatsuka, M., 1998. Occupational Leukoderma in Workers Engaged in 4-(p-Hydroxyphenyl)-2-Butanone Manufacturing. *Journal of Occupational Health*, 40(2), 118-122.
- García, V., Pääkilä, J., Ojamo, H., Muurinen, E. and Keiski, R.L., 2011. Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency. *Renewable and sustainable energy reviews*, 15(2), 964-980.
- Gerdin, E., Tydén, O. and Eriksson, U.J., 1985. The development of antioxidant enzymatic defense in the perinatal rat lung: activities of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase. *Pediatric research*, 19(7), 687-691.
- Geudens, I. and Gerhardt, H., 2011. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development*, 138(21), 4569-4583.
- Gillette, L.A., Miller, D.L. and Redman, H.E., 1952. Appraisal of a Chemical Waste Problem by Fish Toxicity Tests. *Sewage Ind. Wastes* 24(11):1397-1401.

- Girault, V., Gilard, V., Marguet, F., Lesueur, C., Hauchecorne, M., Ramdani, Y., Laquerrière, A., Marret, S., Jégou, S., Gonzalez, B.J., Brasse-Lagnel, C. and Bekr, S., 2017. Prenatal alcohol exposure impairs autophagy in neonatal brain cortical microvessels. *Cell death & disease*, 8(2), e2610.
- Goessling, W. and Sadler, K.C., 2015. Zebrafish: an important tool for liver disease research. *Gastroenterology*, 149(6), 1361-1377.
- Goessling, W., North, T.E., Lord, A.M., Ceol, C., Lee, S., Weidinger, G., Bourque, C., Strijbosch, R., Haramis, A.P., Puder, M., Clevers, H., Moon, R.T. and Zon, L.I., 2008. APC mutant zebrafish uncover a changing temporal requirement for wnt signaling in liver development. *Developmental biology*, 320(1), 161-174.
- Goetz, S.C. and Anderson, K.V., 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Reviews Genetics*, 11(5), 331-344.
- Good, P., 1996. A good public debate. *Addiction*, 91(4), 477-481.
- Goodlett, C.R. and Horn, K.H., 2001. "Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system." *Alcohol research and health* 25(3): 175-184.
- Granados-Riveron, J.T. and Brook, J.D., 2012. The impact of mechanical forces in heart morphogenesis. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(1), 132-142.
- Grant, B.F., Dawson, D.A., Stinson, F.S., Chou, S.P., Dufour, M.C. and Pickering, R.P., 2004. The 12-month prevalence and trends in DSM-IV alcohol abuse and dependence: United States, 1991–1992 and 2001–2002. *Drug and alcohol dependence*, 74(3), 223-234.
- Grant, K.A. and Samson, H.H., 1981. Ethanol and tertiary butanol induced microcephaly in the neonatal rat: comparison of brain growth parameters. *Neurobehavioral toxicology and teratology*, 4(3), 315-321.
- Grimes, A.C. and Kirby, M.L., 2009. The outflow tract of the heart in fishes: anatomy, genes and evolution. *Journal of fish biology*, 74(5), 983-1036.
- Grimes, D.T., Boswell, C.W., Morante, N.F.C., Henkelman, R.M., Burdine, R.D. and Ciruna, B., 2016. Zebrafish models of idiopathic scoliosis link cerebrospinal fluid flow defects to spine curvature. *Science*, 352(6291), 1341-1344.
- Guerri, C., 2002. Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotoxicity research*, 4(4), 327-335.
- Guo, L., Yamashita, H., Kou, I., Takimoto, A., Meguro-Horike, M., Horike, S. I., Sakuma, T., Miura, S., Adachi, T., Yamamoto, T., Ikegawa, S., Hiraki, Y. and Shukunami, C., 2016. Functional investigation of a non-coding variant associated with adolescent idiopathic scoliosis in zebrafish: elevated expression of the ladybird homeobox gene causes body axis deformation. *PLoS genetics*, 12(1), e1005802.
- Gutteridge, J.M., 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12), 1819-1828.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. and Nusslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- Hahn, C. and Schwartz, M.A., 2009. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(1), 53-62.

- Hahn, H.D., Dambkes, G., Rupprich N. And Bahl H., 2010. Butanols, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6:417-430.
- Hall, R.L. and Oser, B.L., 1965. Recent Progress in Consideration of Flavoring Ingredients Under Food Additives Amendment. 3. Gras Substances. Food Technology, 19(2 P 2), 151.
- Hallare, A., Nagel, K., Köhler, H.R. and Tribskorn, R., 2006. Comparative embryotoxicity and proteotoxicity of three carrier solvents to zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Ecotoxicology and environmental safety, 63(3), 378-388.
- Hallare, A.V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H.R. and Tribskorn, R., 2005. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Journal of Thermal Biology, 30(1), 7-17.
- Hanneman, E., Trevarrow, B., Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B. and Westerfield, M., 1988. Segmental pattern of development of the hindbrain and spinal cord of the zebrafish embryo. Development, 103(1), 49-58.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Floreani, N., Gorantla, S., Morsey, B. and Persidsky, Y., 2008. Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. Free Radical Biology and Medicine, 45(11), 1542-1550.
- Hardy, J., Adolfsson, R., Alafuzoff, I., Bucht, G., Marcusson, J., Nyberg, P., Per Dahl, E., Wester, P. and Winblad, B., 1985. Transmitter deficits in Alzheimer's disease. Neurochemistry international, 7(4), 545-563.
- Henderson, G.I., Chen, J. and Schenker, S., 1999. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. Front Biosci, 4(4), 541-550.
- Herbert, S. P. and Stainier, D.Y., 2011. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. Nature reviews Molecular cell biology, 12(9), 551-564.
- Hernández, J.A., López-Sánchez, R.C. and Rendón-Ramírez, A., 2016. Lipids and oxidative stress associated with ethanol-induced neurological damage. Oxidative medicine and cellular longevity, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1543809>.
- Hill, A.J., Howard, C.V. and Cossins, A.R., 2002. Efficient embedding technique for preparing small specimens for stereological volume estimation: zebrafish larvae. Journal of microscopy, 206(3), 179-181.
- Hinton, D.E. and Couch, J.A., 1998. Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: relationship to experimentally-induced neoplastic responses. In Fish ecotoxicology, 141-164.
- Hipolito, L., Sanchez, M.J., Polache, A. and Granero, L., 2007. Brain metabolism of ethanol and alcoholism: an update. Current drug metabolism, 8(7), 716-727.
- Hisaoka, K.K. and Battle, H.I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *brachydanio rerio* (hamilton-buchanan). Journal of Morphology, 102(2), 311-327.
- Hofsteen, P., Plavicki, J., Johnson, S.D., Peterson, R.E. and Heideman, W., 2013. Sox9b is required for epicardium formation and plays a role in TCDD-induced heart malformation in zebrafish. Molecular pharmacology, mol-113.
- Holtzman, N.G., Schoenebeck, J.J., Tsai, H.J. and Yelon, D., 2007. Endocardium is necessary for cardiomyocyte movement during heart tube assembly. Development, 134(12), 2379-2386.

- Hove, J.R., Köster, R.W., Forouhar, A.S., Acevedo-Bolton, G., Fraser, S.E. and Gharib, M., 2003. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature*, 421(6919), 172-177.
- Howard, P.H., Sage, G.W., Jarvis, W.F. and Gray, D.A., 1990. Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals. Volume II: solvents.
- Howarth, D.L., Yin, C., Yeh, K. and Sadler, K.C., 2013. Defining hepatic dysfunction parameters in two models of fatty liver disease in zebrafish larvae. *Zebrafish*, 10(2), 199-210.
- Huang, H., Liu, H. and Gan, Y.R., 2010. Genetic modification of critical enzymes and involved genes in butanol biosynthesis from biomass. *Biotechnology advances*, 28(5), 651-657.
- Ibrahim, M., Balakrishnan, A., Prakash, S. and Lee, H.J., 2014. Effect of Ethanol Exposure on Heart Development in Zebra Fish (*Danio rerio*) Embryos. *International Journal of Anatomical Sciences*, 5(1):26-33.
- Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Stefovská, V., Horster, F., Tenkova, T., Dikranian, K. and Olney, J.W., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287(5455), 1056-1060.
- Ilaiyaraja, N. and Khanum, F., 2011. Amelioration of alcohol-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats by *Acorus calamus*. *Journal of dietary supplements*, 8(4), 331-345.
- Ingham, P.W. and McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development*, 15(23), 3059-3087.
- Iseki, S., Araga, A., Ohuchi, H., Nohno, T., Yoshioka, H., Hayashi, F. and Noji, S., 1996. Sonic Hedgehog Is Expressed in Epithelial Cells during Development of Whisker, Hair, and Tooth. *Biochemical and biophysical research communications*, 218(3), 688-693.
- Jaddou, H. A., Pavey, J.A. and Manning, D.J., 1978. Chemical Analysis of Flavor Volatiles in Heat-Treated Milks. *J.Dairy Res.* 45: 391-403. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol. WHO.
- Jenner, P.M., Hagan, E.C., Taylor, J.M., Cook, E.L. and Fitzhugh, O.G., 1964. Food flavourings and compounds of related structure I. Acute oral toxicity. *Food and Cosmetics Toxicology*, 2, 327-343.
- Jin, C., Yao, M., Liu, H., Chia-fon, F.L. and Ji, J., 2011. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(8), 4080-4106.
- Jones, D.T. and Woods, D.R., 1986. Acetone-Butanol Fermentation Revisited, *Microbiological*, 50(4):484–524.
- Jorgensen, H., Kristensen, J.B. and Felby, C., 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities, *Society of chemical industry*, 1(2):119–134.
- Jörnvall, H., Danielsson, O., Hjelmqvist, L., Persson, B. and Shafqat, J., 1995. The alcohol dehydrogenase system. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism* 5 (pp. 281-294). Springer US.

- Juhnke, I. and Lüedeman, D., 1978. Results of the Study of 200 Chemical Compounds on Acute Fish Toxicity Using the Golden Orfe Test. *Z. Wasser Abwasser Forsch.* 11(5):161-164.
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N. and Shishibori, T., 2003. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environmental research*, 93(1), 31-35.
- Kasamatsu, S., Hachiya, A., Nakamura, S., Yasuda, Y., Fujimori, T., Takano, K., Moriwaki, S., Hase, T., Suzuki, T. and Matsunaga, K., 2014. Depigmentation caused by application of the active brightening material, rhododendrol, is related to tyrosinase activity at a certain threshold. *Journal of dermatological science*, 76(1), 16-24.
- Kashyap, B., Frederickson, L.C. and Stenkamp, D.L., 2007. Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Visual neuroscience*, 24(3), 409-421.
- Kashyap, B., Frey, R.A. and Stenkamp, D.L., 2011. Ethanol-Induced Microphthalmia is Not Mediated by Changes in Retinoic Acid or Sonic Hedgehog Signaling During Retinal Neurogenesis. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(9), 1644-1661.
- Keegan, B.R., Meyer, D. and Yelon, D., 2004. Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development*, 131(13), 3081-3091.
- Kercmar, J., Tobet, S.A. and Majdic, G., 2014. Social isolation during puberty affects female sexual behavior in mice. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8:337.
- Kiecker, C., 2016. The chick embryo as a model for the effects of prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. *Developmental biology*, 415(2), 314-325.
- Kikuchi, K., Gupta, V., Wang, J., Holdway, J.E., Wills, A.A., Fang, Y. and Poss, K.D., 2011. tcf21⁺ epicardial cells adopt non-myocardial fates during zebrafish heart development and regeneration. *Development*, 138(14), 2895-2902.
- Kim, M.S., Louis, K.M., Pedersen, J.A., Hamers, R.J., Peterson, R.E., and Heideman, W., 2014. Using citrate-functionalized TiO₂ nanoparticles to study the effect of particle size on zebrafish embryo toxicity, *Analyst*, 139, 964-972.
- Kim, M., Baek, H.S., Lee, M., Park, H., Shin, S.S., Choi, D.W. and Lim, K.M., 2016. Rhododenol and raspberry ketone impair the normal proliferation of melanocytes through reactive oxygen species-dependent activation of GADD45. *Toxicology in Vitro*, 32, 339-346.
- Kimmel, C.B. and Law, R.D., 1985. Cell lineage of zebrafish blastomeres: I. Cleavage pattern and cytoplasmic bridges between cells. *Developmental biology*, 108(1), 78-85.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203(3), 253-310.
- Kirschner, M., 2006. n-butanol. *Chemical Market Reporter*, 30 Jan–5 February, ABI/INFORM Global; p 42.
- Koç, A.F., Zorludemir, S. ve Bozdemir, H., 2004. A Family With Chronic Progressive External Ophthalmoplegia. *Turkish journal of medical sciences*, 34(3), 199-203.
- Kondo, M., Kawabata, K., Sato, K., Yamaguchi, S., Hachiya, A., Takahashi, Y. and Inoue, S., 2016. Glutathione maintenance is crucial for survival of melanocytes

- after exposure to rhododendrol. *Pigment cell & melanoma research*, 29(5), 541-549.
- Kopp, R., Schwerte, T., Egg, M., Sandbichler, A.M., Egger, B. and Pelster, B., 2010. Chronic reduction in cardiac output induces hypoxic signaling in larval zebrafish even at a time when convective oxygen transport is not required. *Physiological genomics*, 42(1), 8-23.
- Kotch, L.E., Chen, S.Y. and Sulik, K.K., 1995. Ethanol-induced teratogenesis: Free radical damage as a possible mechanism. *Teratology*, 52(3), 128-136.
- Krenz, M. and Korthuis, R.J., 2012. Moderate ethanol ingestion and cardiovascular protection: from epidemiologic associations to cellular mechanisms. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 93–104.
- Krivoruchko, A., Serrano-Amatriain, C., Chen, Y., Siewers, V. and Nielsen, J., 2013. Improving biobutanol production in engineered *Saccharomyces cerevisiae* by manipulation of acetyl-CoA metabolism, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, 40(9):1051–6.
- Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve P., 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, *Industrial and engineering chemistry*, 48(8):3713–3729.
- Kuroda, Y., Takahashi, Y., Sakaguchi, H., Matsunaga, K. and Suzuki, T., 2014. "Depigmentation of the skin induced by 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol is spontaneously re-pigmented in brown and black guinea pigs." *The Journal of toxicological sciences* 39(4): 615-623.
- Laale, H.W., 1971. Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 177(1), 51-64.
- Laale, H.W., 1977. Culture and preliminary observations of follicular isolates from adult zebra fish, *Brachydanio rerio*. *Canadian journal of zoology*, 55(2), 304-309.
- Laufer, E., Nelson, C.E., Johnson, R.L., Morgan, B.A. and Tabin, C., 1994. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell*, 79(6), 993-1003.
- Lazarevic-Pasti, T., Leskovac, A., Momić, T., Petrović, S. and Vasic, V., 2017. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: from Alzheimer's Disease to Anti-cancer Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, doi: 10.2174/0929867324666170705123509.
- Lazic, S. and Scott, I.C., 2011. Mef2cb regulates late myocardial cell addition from a second heart field-like population of progenitors in zebrafish. *Developmental biology*, 354(1), 123-133.
- Le Douarin, N. and Kalcheim, C., 1999. *The neural crest*. No. 36. Cambridge university press. New York, NY, USA
- Lee, L., 2013. Riding the wave of ependymal cilia: genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *Journal of neuroscience research*, 91(9), 1117-1132.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J. and Jung, K.S., 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*, *Biotechnology and bioengineering*, 101(2):209–28.

- Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G. and Poss, K.D., 2006. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell*, 127(3), 607-619.
- Levy, C., Khaled, M. and Fisher, D.E., 2006. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine*, 12(9), 406-414.
- Li, X., Gao, A., Wang, Y., Chen, M., Peng, J., Yan, H., Zhao, X., Feng, X. and Chen, D., 2016. Alcohol exposure leads to unrecoverable cardiovascular defects along with edema and motor function changes in developing zebrafish larvae. *Biology open*, 5(8), 1128-1133.
- Linden, E., Bengtsson, B.E., Svanberg, O. and Sundstroem, G., 1979. The Acute Toxicity of 78 Chemicals and Pesticide Formulations Against Two Brackish Water Organisms, the Bleak (*Alburnus Alburnus*) and the Harpacticoid (*Nitrocraspinipes*). *Chemosphere*, 8: 843-851.
- Lindsey, S.E., Butcher, J.T. and Yalcin, H.C., 2014. Mechanical regulation of cardiac development. *Frontiers in physiology*, 5:318.
- Liu, W., Chen, J.R., Hsu, C.H., Li, Y.H., Chen, Y.M., Lin, C.Y., Huang, S.J., Chang, Z.K., Chen, Y.C., Lin, C.H., Gong, H.Y., Lin, C.C., Kawakami, K. and Wu, J.L., 2012. A zebrafish model of intrahepatic cholangiocarcinoma by dual expression of hepatitis B virus X and hepatitis C virus core protein in liver. *Hepatology*, 56(6), 2268-2276.
- Liu, Y., Balaraman, Y., Wang, G., Nephew, K.P. and Zhou, F.C., 2009. Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics*, 4(7), 500-511.
- Lowery, L.A. and Sive, H., 2005. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development*, 132(9), 2057-2067.
- Lu, C., Jiang, Y., Zhang, F., Shao, J., Wu, L., Wu, X., Lian, N., Chen, L., Jin, H., Chen, Q., Lu, Y. and Zheng, S., 2015. Tetramethylpyrazine prevents ethanol-induced hepatocyte injury via activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2. *Life sciences*, 141, 119-127.
- Madan, V.K., Hillmer, P. and Gottschalk, G., 1973. Purification and Properties of NADP- Dependent L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase from *Clostridium kluyveri*. *The FEBS Journal*, 32(1), 51-56.
- Mahler, G.J. and Butcher, J.T., 2011. Cardiac developmental toxicity. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(4), 291-297.
- Mariucci, G., Ambrosini, M.V., Colarieti, L. and Bruschelli, G., 1990. Differential changes in Cu, Zn and Mn superoxide dismutase activity in developing rat brain and liver. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 46(7), 753-755.
- Martin, R.T. and Bartman, T., 2009. Analysis of heart valve development in larval zebrafish. *Developmental Dynamics*, 238(7), 1796-1802.
- Matrone, G., Wilson, K.S., Mullins, J.J., Tucker, C.S. and Denvir, M.A., 2015. Temporal cohesion of the structural, functional and molecular characteristics of the developing zebrafish heart. *Differentiation*, 89(5), 117-127.
- Mattson, V.R., Arthur, J.W., and Walbridge, C.T., 1976. Acute toxicity of selected organic compounds to fathead minnows. Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency.

- McCollum, C.W., Ducharme, N.A., Bondesson, M. and Gustafsson, J.A., 2011. Developmental toxicity screening in zebrafish. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 93(2), 67-114.
- McGregor, D., 2010. Tertiary-Butanol: a toxicological review. *Critical reviews in toxicology*, 40(8), 697-727.
- McLaughlin Jr, J., Marliac, J.P., Verrett, M.J., Mutchler, M.K. and Fitzhugh, O.G., 1964. Toxicity of fourteen volatile chemicals as measured by the chick embryo method. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 25(3), 282-284.
- Merck, 1983. Merck Index. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 10th Ed. 1983. As reported in Howard, P.H. (ed.). 1990. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*, Volume II. Lewis Publishers. Chelsea, Michigan.
- Milgrom-Hoffman, M., Harrelson, Z., Ferrara, N., Zelzer, E., Evans, S.M. and Tzahor, E., 2011. The heart endocardium is derived from vascular endothelial progenitors. *Development*, 138(21), 4777-4787.
- Moorman, A.F. and Christoffels, V.M., 2003. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiological reviews*, 83(4), 1223-1267.
- Müller, T.E., Nunes, S.Z., Silveira, A., Loro, V.L. and Rosemberg, D.B., 2017. Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of zebrafish. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 79: 105-111, <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.05.026>.
- Napoli, F., Olivieri, G., Russo, M.E., Marzocchella, A. and Salatino, P., 2010. Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a continuous packed bed reactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(6), 603-608.
- Nelson, B.K., Brightwell, W.S., Khan, A. and Shaw, P.B., 1991. Behavioral teratology investigation of tertiary-butanol administered by inhalation to rats. *Pharmacopschoecologia* 4 (1-2), 1-7.
- Nelson, B.K., Brightwell, W.S., Khan, A., Burg, J.R. and Goad, P.T., 1989a. Lack of selective developmental toxicity of three butanol isomers administered by inhalation to rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 12(3), 469-479.
- Nelson, B.K., Brightwell, W.S., Robertson, S.K., Khan, A., Krieg, E.F. and Massari, V.J., 1989b. Behavioral teratology investigation of 1-butanol in rats. *Neurotoxicology and teratology*, 11(3), 313-315.
- Nguyen, A.T., Emelyanov, A., Koh, C.H.V., Spitsbergen, J.M., Parinov, S. and Gong, Z., 2012. An inducible krasV12 transgenic zebrafish model for liver tumorigenesis and chemical drug screening. *Disease models & mechanisms*, 5(1), 63-72.
- NIOSH, 1990. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) National Exposure Survey (1981-1983), Unpublished Provisional Data NIOSH, Cincinnati, OH (1990).
- Ni, Y. and Sun, Z., 2009. Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(3), 415.
- Niemistö, P., 2013. Effect of growing density on biomass and stem volume growth of downy birch stands on peatland in Western and Northern Finland. *Silva Fennica* vol. 47 no. 4 article id 1002.

- Nissenkorn, A., Zeharia, A., Lev D., Watemberg, N., Fattal-Valevski, A., Barash, V., Gutman, A., Harel, S. and Lerman-Sagie, T., 2000. "Neurologic presentations of mitochondrial disorders." *Journal of child Neurology* 15(1): 44-48.
- Noël, E.S., dos Reis, M., Arain, Z. and Ober, E.A., 2010. Analysis of the Albumin/ α -Fetoprotein/Afamin/Group specific component gene family in the context of zebrafish liver differentiation. *Gene Expression Patterns*, 10(6), 237-243.
- North, T.E., Babu, I.R., Vedder, L.M., Lord, A.M., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Zon, L.I. and Goessling, W., 2010. PGE2-regulated wnt signaling and N-acetylcysteine are synergistically hepatoprotective in zebrafish acetaminophen injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17315-17320.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2001. Harmonised Hazard Classification Criteria for Mixtures. In: *Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures*, Report ENV/JM/MONO (2001) 6, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), 2004. Isobutanol, CAS No. 78-83-1. SIAM Initial Assessment Report for SIAM 19. UNEP Publications.
- Olejek, A., Bodzek, P., Skutil, M., Zamłyński, J. and Stołtny, P., 2011. Cyclopia—literature review and a case report. *Ginekologia polska*, 82(3).
- Olivey, H.E. and Svensson, E.C., 2010. Epicardial–myocardial signaling directing coronary vasculogenesis. *Circulation research*, 106(5), 818-832.
- Olney, J.W., Ishimaru, M.J., Bittigau, P. and Ikonomidou, C., 2000. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis*, 5(6), 515-521.
- Olney, J.W., Tenkova, T., Dikranian, K., Qin, Y.Q., Labruyere, J. and Ikonomidou, C., 2002. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Developmental Brain Research*, 133(2), 115-126.
- Oxendine, S.L., Cowden, J., Hinton, D.E. and Padilla, S., 2006. Vulnerable windows for developmental ethanol toxicity in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *Aquatic toxicology*, 80(4), 396-404.
- Palosaari, N.R. and Rogers, P., 1988. Purification and Properties of the Inducible Coenzyme A-Linked Butyraldehyde Dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*, *Bacteriology*, 170(7):2971–2976.
- Passeri, M.J., Cinaroglu, A., Gao, C. and Sadler, K.C., 2009. Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology*, 49(2), 443-452.
- Patten, B.M., 2008. *Early embryology of the chick*. Wildside Press LLC.
- Patty, F.A., 1948. *Industrial Hygiene and Toxicology*. Vol. 1. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*. WHO.
- Peralta, M., Steed, E., Harlepp, S., González-Rosa, J.M., Monduc, F., Ariza-Cosano, A., Cortés, A., Rayón, T., Gómez-Skarmeta, J.L., Zapata, A., Vermot, J. and Mercader, N., 2013. Heartbeat-driven pericardiac fluid forces contribute to epicardium morphogenesis. *Current Biology*, 23(18), 1726-1735.

- Peralta-Yahya, P.P., Zhang F., Del Cardayre, S.B. and Keasling, J.D., 2012. Microbial engineering for the production of advanced biofuels, *Nature*, 488(7411):320–328.
- Phunchago, N., Wattanathorn, J. and Chaisiwamongkol, K., 2015. Tiliacora triandra, an anti-intoxication plant, improves memory impairment, neurodegeneration, cholinergic function, and oxidative stress in hippocampus of ethanol dependence rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/918426>.
- Plavicki, J.S., Hofsteen, P., Yue, M.S., Lanham, K.A., Peterson, R.E. and Heideman, W., 2014. Multiple modes of proepicardial cell migration require heartbeat. *BMC developmental biology*, 14(1), 18.
- Polverini, P.J., 2002. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of dental education*, 66(8), 962-975.
- Postel, W. and Adam, L., 1978. Gas Chromatographic Characterization of Whiskey. III. Irish Whiskey. *Brannt Wein Wirtschaft*, 118: 404-407. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert- Butanol Isobutanol*. WHO.
- Potz, B.A., Lawandy, I.J., Clements, R.T. and Sellke, F.W., 2016. Alcohol modulates autophagy and apoptosis in pig liver tissue. *Journal of Surgical Research*, 203(1), 154-162.
- Purchase, I.F.H., 1969. Studies in kaffircorn malting and brewing-XXII. The acute toxicity of some fusel oils found in Bantu beer. *South African Medical Journal*, 43(25), 795-798.
- Qureshi, N., Liu, S. and Ezeji, T.C., 2013. Cellulosic butanol production from agricultural biomass residues: recent advances in technology. In: Lee, James.W. (Ed.), *Advanced Biofuels and Bioproducts*. Springer Science + Business Media LLC, New York, USA, pp. 247–265.
- Qureshi, N., Saha, B.C., Dien, B., Hector, R.E. and Cotta, M.A., 2010. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: Part I – Use of barley straw hydrolysate, *Biomass and bioenergy*, 34(4):559–565.
- Rakopoulos, C.D., Dimaratos, A.M., Giakoumis, E.G. and Rakopoulos, D.C., 2010. Investigating the emissions during acceleration of a turbocharged diesel engine operating with bio-diesel or n-butanol diesel fuel blends. *Energy*, 35(12), 5173-5184.
- Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G. and Charness, M.E., 1996. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *The Journal of Cell Biology*, 133(2), 381-390.
- Ramlan, N.F., Sata, N.S.A.M., Hassan, S.N., Bakar, N.A., Ahmad, S., Zulkifli, S.Z., Abdullah, C.A.C. and Ibrahim, W.N.W., 2017. Time dependent effect of chronic embryonic exposure to ethanol on zebrafish: Morphology, biochemical and anxiety alterations. *Behavioural Brain Research*. 332:40-49.
- Reilly, C.A. and Aust, S.D., 2001. Measurement of lipid peroxidation. *Current protocols in toxicology*, 2-4.
- Reimers, M.J., Flockton, A.R. and Tanguay, R.L., 2004. Ethanol-and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 26(6), 769-781.

- Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J. and Tanguay, R. L., 2006. Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicology and teratology*, 28(4), 497-508.
- Reis, R., Charehsaz, M., Sipahi, H., Ekici, A.I.D., Macit, Ç., Akkaya, H. and Aydın, A., 2017. Energy Drink Induced Lipid Peroxidation and Oxidative Damage in Rat Liver and Brain When Used Alone or Combined with Alcohol. *Journal of Food Science*, 82(4), 1037-1043.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., de Bem Arizi, M., Bernardi, G.F., Dias, R.D., Bogo, M.R. and Bonan, C.D., 2006. Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in zebrafish brain. *Neurotoxicology and teratology*, 28(4), 489-496.
- Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Dias, R.D., Bogo, M.R. and Bonan, C.D., 2007. Ethanol alters acetylcholinesterase activity and gene expression in zebrafish brain. *Toxicology Letters*, 174(1), 25-30.
- Rohr, S., Otten, C. and Abdelilah-Seyfried, S., 2008. Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish. *Circulation research*, 102(2), e12-e19.
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan C.D., Moreira, J.C., Klamt, F. and Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience*, 171(3), 683-692.
- Rosenfeld, C., Kousba, A. and Sultatos, L.G., 2001. Interactions of rat brain acetylcholinesterase with the detergent Triton X-100 and the organophosphate paraoxon. *Toxicological Sciences*, 63(2), 208-213.
- Sabaliauskas, N.A., Foutz, C.A., Mest, J.R., Budgeon, L.R., Sidor, A.T., Gershenson, J.A., Joshi, S.B. and Cheng, K.C., 2006. High-throughput zebrafish histology. *Methods*, 39(3), 246-254.
- Sadler, K.C., Amsterdam, A., Soroka, C., Boyer, J. and Hopkins, N., 2005. A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease. *Development*, 132(15), 3561-3572.
- Sadler, K.C., Krahm, K.N., Gaur, N.A. and Ukomadu, C., 2007. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), 1570-1575.
- Sakkas, D., Jaquenoud, N., Leppens, G. and Campana, A., 1994. Comparison of results after in vitro fertilized human embryos are cultured in routine medium and in coculture on Vero cells: a randomized study. *Fertility and sterility*, 61(3), 521-525.
- Santos-Ledo, A., Arenzana, F.J., Porteros, A., Lara, J., Velasco, A., Aijón, J. and Arévalo, R., 2011. Cytoarchitectonic and neurochemical differentiation of the visual system in ethanol-induced cyclopic zebrafish larvae. *Neurotoxicology and teratology*, 33(6), 686-697.
- Sari, Y. and Gozes, I., 2006. Brain deficits associated with fetal alcohol exposure may be protected, in part, by peptides derived from activity-dependent neurotrophic factor and activity-dependent neuroprotective protein. *Brain research reviews*, 52(1), 107-118.

- Sarmah, S. and Marrs, J.A., 2013. Complex cardiac defects after ethanol exposure during discrete cardiogenic events in zebrafish: prevention with folic acid. *Developmental Dynamics*, 242(10), 1184-1201.
- Sasaki, M., Kondo, M., Sato, K., Umeda, M., Kawabata, K., Takahashi, Y., Suzuki, T., Matsunaga, K. and Inoue, S., 2014. "Rhododendrol, a depigmentation-inducing phenolic compound, exerts melanocyte cytotoxicity via a tyrosinase-dependent mechanism." *Pigment cell & melanoma research* 27(5): 754-763.
- Schilling, T.F., 2002. The morphology of larval and adult zebrafish. *Zebrafish*, 261, 59-94.
- Schreier, P., Drawert, F. and Winkler, F., 1979. Composition of Neutral Volatile Constituents in Grape Brandies. *J. Agric. Food Chem.*, 27: 365-372. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria* 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol. WHO.
- Simon, M.J. and Iliff, J.J., 2016. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 442-451.
- Singla, V. and Reiter, J.F., 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science*, 313(5787), 629-633.
- Sipes, N.S., Padilla, S., and Knudsen, T. B., 2011. Zebrafish: as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93(3), 256-267.
- Sitarek, K., Berlinska, B. and Baranski, B., 1994. Assessment of the effect of n-butanol given to female rats in drinking water on fertility and prenatal development of their offspring. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 7(4), 365-370.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. and Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13-34.
- Stainier, D.Y., Lee, R.K. and Fishman, M.C., 1993. Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Development*, 119(1), 31-40.
- Stanton, M.F., 1965. Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, *Brachydanio rerio*. *Journal of the National Cancer Institute*, 34(1), 117-130.
- Steiner, J.L. and Lang, C.H., 2017. Etiology of alcoholic cardiomyopathy: mitochondria, oxidative stress and apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 89, 125–135.
- Sterner, J.H., Crouch, H.C., Brockmyre, H.F. and Cusack, M., 1949. A ten-year study of butyl alcohol exposure. *American Industrial Hygiene Association Quarterly*, 10(3), 53-59.
- Strahle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. and Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod. Toxicol.* 33, 128-132.
- Streissguth, A.P. and Martin, J.C., 1983. Prenatal effects of alcohol abuse in humans and laboratory animals. In *The biology of alcoholism* (pp. 539-589). Springer US.

- Streissguth, A.P., 1997. Fetal alcohol syndrome: A guide for families and communities. Paul H Brookes Publishing.
- Sulik, K.K., Cook, C.S. and Webster, W.S., 1988. Teratogens and craniofacial malformations: relationships to cell death. *Development*, 103(Supplement), 213-232.
- Sulik, K.K., 2005. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Experimental biology and medicine*, 230(6), 366-375.
- Sulukan, E., Kokturk, M., Ceylan, H., Beydemir, S., Isik, M., Atamanalp, M., Ceyhun, S.B., 2017. An approach to clarify the effect mechanism of glyphosate on body malformations during embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180, 77-85.
- Sun, Y.I., Oberley, L.W. and Li, Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.
- Sun, A.Y. and Sun, G.Y., 2001. Ethanol and oxidative mechanisms in the brain. *Journal of biomedical science*, 8(1), 37-43.
- Sun, W., Chen, L., Zheng, W., Wei, X., Wu, W., Duysen, E.G. and Jiang, W., 2017. Study of acetylcholinesterase activity and apoptosis in SH-SY5Y cells and mice exposed to ethanol. *Toxicology*, 384, 33-39.
- Sylvain, N.J., Brewster, D.L. and Ali, D.W., 2010. Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers. *Neurotoxicology and teratology*, 32(4), 472-480.
- Şişman, T., 2007. Poliklorlu bifenil bileşiklerinin *Danio rerio*'nun (zebra balığı) gelişimi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tabershaw, I.R., Fahy, J.P. and Skinner, J.B., 1944. Industrial Exposure to Butanol. *Journal of Industrial Hygiene and Toxicology*, 26(10), 328-30.
- Tang, N., Farah, B., He, M., Fox, S., Malouf, A., Littner, Y. and Bearer, C.F., 2011. Ethanol causes the redistribution of L1 cell adhesion molecule in lipid rafts. *Journal of neurochemistry*, 119(4), 859-867.
- Teplova, V.V., Kruglov, A.G., Kovalyov, L.I., Nikiforova, A.B., Fedotcheva, N.I. and Lemasters, J.J., 2017. Glutamate contributes to alcohol hepatotoxicity by enhancing oxidative stress in mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 49(3):253-264.
- Togbé, C., Mzé-Ahmed, A. and Dagaut, P., 2010. Kinetics of oxidation of 2-butanol and isobutanol in a jet-stirred reactor: experimental study and modeling investigation. *Energy & Fuels*, 24(9), 5244-5256.
- Tokura, Y., Fujiyama, T., Ikeya, S., Tatsuno, K., Aoshima, M., Kasuya, A. and Ito, T., 2015. Biochemical, cytological, and immunological mechanisms of rhododendrol-induced leukoderma. *Journal of dermatological science*, 77(3), 146-149.
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A. C., Comaklı, S., Acıl, G., Kokturk, M. and Atamanalp, M., 2017. Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: Assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175, 186-191.
- Trinh, L.A. and Stainier, D.Y., 2004. Fibronectin regulates epithelial organization during myocardial migration in zebrafish. *Developmental cell*, 6(3), 371-382.

- Truong, L., Harper, S.L. and Tanguay, R. L., 2011. Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols*, 271-279.
- Tsuji, S., Tonogai, Y., Ito, Y. and Kanoh, S., 1986. The Influence of Rearing Temperatures on the Toxicity of Various Environmental Pollutants for Killifish (*Oryzias latipes*). *J. Hyg. Chem. / Eisei Kagaku* 32:46-53.
- Tsukamoto, H., Towner, S.J., Clofalo, L.M. and French, S.W., 1986. Ethanol-induced liver fibrosis in rats fed high fat diet. *Hepatology*, 6(5), 814-822.
- Union Carbide Corporation, 1951. Bushy Run Research Center., Project Report No. 14-73. Export, PA. As cited in Summary of Responses to the OECD Request for Available Data on HVP Chemicals. 1999.
- Union Carbide Corporation. 1992. Material Safety Data Sheet. Dated March 20, 1992. C0269D. Solvents and Coatings Materials Division, Union Carbide Corporation. As cited in Chemical Manufacturers Association. Summary of Responses to the OECD Request for Available Data on HVP Chemicals. February 8, 1999.
- Varjosalo, M. and Taipale, J., 2008. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes & development*, 22(18), 2454-2472.
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A. and Spanagel, R., 2008. Neuropharmacology of alcohol addiction. *British journal of pharmacology*, 154(2), 299-315.
- Wang, P., Luo, Q., Qiao, H., Ding, H., Cao, Y., Yu, J., Liu, R., Zhang, Q., Zhu, H. and Qu, L., 2017. The Neuroprotective Effects of Carvacrol on Ethanol-Induced Hippocampal Neurons Impairment via the Antioxidative and Antiapoptotic Pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*, ID 4079425, 17, <https://doi.org/10.1155/2017/4079425>.
- Watanabe, H., Yamazaki, M., Miyazaki, H., Arikawa, C., Itoh, K., Sasaki, T., Maehama, T., Frohman, M.A. and Kanaho, Y., 2004. Phospholipase D2 functions as a downstream signaling molecule of MAP kinase pathway in L1-stimulated neurite outgrowth of cerebellar granule neurons. *Journal of neurochemistry*, 89(1), 142-151.
- Weast, R.C. and Astle, M.J., 1985. *CRC Handbook of Data on Organic Compounds. Volumes I and II*. CRC Press Inc. Boca Raton, FL.
- Weiss, O., Kaufman, R., Mishani, E. and Inbal, A., 2017. Ocular vessel patterning in zebrafish is indirectly regulated by Hedgehog signaling. *The International journal of developmental biology*, 61(3-4-5), 277.
- Weissermel, K. and Arpe, H.J., 2004. *Industrial organic chemistry. Synthesis*, 7, 1127-1127.
- West, J.R., Chen, W.J.A. and Pantazis, N.J., 1994. Fetal alcohol syndrome: The vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metabolic Brain Disease* 9: 291.
- Wilkemeyer, M.F., Sebastian, A. B., Smith, S. A. and Charness, M. E., 2000. Antagonists of alcohol inhibition of cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3690-3695.
- Woidich, H., Pfannhauser, W. and Eberhardt, R., 1978. Results of Gas Chromatographic Mass Spectrographic Studies of the Volatile Components of Apple Brandies. *Mitt. Hoeheren Bundeslehrersuchsanst. Wein-Obstbau, Klosterneuberg*, 28: 56-63. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria* 65: Butanols – Four Isomers: 1-Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol. WHO.

- Wong, D.C.L., Dorn, P.B. and Salanitro J.P., 1998. Aquatic Toxicity of Four Oxy-Solvents. Shell Oil Company, Westhollow Technology Center Technical Information Record WTC-3520. Houston, TX.
- Wullimann, M. F. and Mueller, T., 2004. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: evidence from genes to behavior. *Journal of Comparative Neurology*, 475(2), 143-162.
- Xing, H., Jia, K., He, J., Shi, C., Fang, M., Song, L., Zhang, P., Zhao, Y., Fu, J. and Li, S., 2015. Establishment of the tree shrew as an alcohol-induced fatty liver model for the study of alcoholic liver diseases. *PloS one*, 10(6), e0128253.
- Xu, L., Xu, Q.H., Zhou, X.Y., Yin, L.Y., Guan, P.P., Zhang, T. and Liu, J.X., 2017. Mechanisms of silver nanoparticles induced hypopigmentation in embryonic zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 184, 49-60.
- Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H. and Habu, T., 1978. Volatile Flavor Components of Cooked Rice. *Agric. Biol. Chem.*, 42: 1229-1223. As cited in World Health Organization (WHO). 1987. *Environmental Health Criteria 65: Butanols – Four Isomers: 1- Butanol 2-Butanol tert-Butanol Isobutanol*. WHO.
- Yamashita, M., 2003. Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136(4), 731-742.
- Yao, P., Li, K., Jin, Y., Song, F., Zhou, S., Sun, X., Nüssler, A.K. and Liu, L., 2006. Oxidative damage after chronic ethanol intake in rat tissues: prophylaxis of Ginkgo biloba extract. *Food chemistry*, 99(2), 305-314.
- Yaoxian, W., Hui, Y., Yunyan, Z., Yanqin, L., Xin, G. and Xiaoke, W., 2013. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway. *Cancer cell international*, 13(1), 71.
- Yıldırım, H., 2009. Karbonik anhidraz 9 geninin transkripsiyonel kontrolünün moleküler analizi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı.
- Yin, C., Evason, K.J., Maher, J.J. and Stainier, D.Y., 2012. The basic helix-loop-helix transcription factor, heart and neural crest derivatives expressed transcript 2, marks hepatic stellate cells in zebrafish: Analysis of stellate cell entry into the developing liver. *Hepatology*, 56(5), 1958-1970.
- Zhang, C., Ojiaku, P. and Cole, G.J., 2013. Forebrain and hindbrain development in zebrafish is sensitive to ethanol exposure involving agrin, Fgf, and sonic hedgehog function. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 97(1), 8-27.
- Zhang, C., Turton, Q.M., Mackinnon, S., Sulik, K.K. and Cole, G.J., 2011. Agrin function associated with ocular development is a target of ethanol exposure in embryonic zebrafish. *Birth Defects Research Part a: Clinical and Molecular Teratology*, 91(3), 129-141.
- Zhang, Y., Shao, M., Wang, L., Liu, Z., Gao, M., Liu, C. and Zhang, H., 2010. Ethanol exposure affects cell movement during gastrulation and induces split axes in zebrafish embryos. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(4), 283-288.
- Zhou, X., Siu, W.S., Zhang, C., Liu, C.L., Cheng, L., Kwok, H.F., Fung, C.H., Tam, J.C.W., Lau, C.P., Leung, P.C., Hung, L.K., Ko, C.H. and Leung, P.C., 2017. Whole extracts of *Radix Achyranthis Bidentatae* and *Radix Cyathulae* promote

- angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in zebrafish in vivo. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(3), 1032-1038.
- Zhu, Z., Huang, Y., Lingchun, Lv., Tao, Y., Shao, M., Zhao, C., Xue, M., Sun, J., Niu, C., Wang, Y., Kim, M., Cong, W., Mao, W. and Jin, L., 2017. Acute ethanol exposure-induced autophagy-mediated cardiac injury via activation of the ROS-JNK-Bcl-2 pathway, *J. Cell. Physiol.* Doi: 10.1002/jcp.25934.
- Zimatkin, S.M. and Buben, A.L., 2007. Ethanol oxidation in the living brain. *Alcohol & Alcoholism*, 42(6), 529-532.
- Zverlov, V.V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. A. and Schwarz, W.H., 2006. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(5), 587-597.



ÖZGEÇMİŞ

Mine KÖKTÜRK, 18.04.1983 tarihinde İzmir'in Kemalpaşa İlçesinde doğdu. İlköğretimini Atatürk İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Kemalpaşa İmam Hatip Lisesinde, lise eğitimini Özel Rabia Hatun Koleji'nde tamamladı. 2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Maçka Meslek Yüksek Okulu'ndan önlisans eğitimini tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Su Ürünleri Fakültesi'nde lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde yüksek lisans eğitimini tamamladı. Halen Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi'nde 2014 yılında başladığı doktora eğitimine devam etmektedir.