

**RATLARDA KRONİK NONİLFENOL VE C VİTAMİNİ
UYGULAMASININ GEN EKSPRESYON DÜZEYİNE ETKİSİ**

Fahriye ZEMHERİ

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**

**Tez No: 2015-006
2015-Afyonkarahisar**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA KRONİK NONİLFENOL VE
C VİTAMİNİ UYGULAMASININ GEN EKSPRESYON
DÜZEYİNE ETKİSİ**

Fahriye ZEMHERİ

**MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cevdet UĞUZ**

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
13.SAĞ.BİL.13 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2015-006

2015-Afyonkarahisar

KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/07/2015



Prof. Dr. Cevdet UĞUZ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Başkanı




Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Metin ERDOĞAN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Sinan INCE
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye



Yrd. Doç. Dr. Özgecan KORKMAZ AĞAOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Üye

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Fahriye ZEMHERİ'nin "Ratlarda Kronik Nonilfenol ve C Vitamini Uygulamasının Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi" başlıklı tezi 22/07/2015 günü saat 14:00 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Abdullah ERYAVUZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında beni bilgilendiren değerli danışman hocam Prof. Dr. Cevdet UĞUZ'a, teşekkürlerimi sunarım. Tüm laboratuvar çalışmalarında, her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Metin ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Yakın ilgi ve yardımlarını gördüğüm hocam Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT'a ve laboratuvar çalışmalarında benden desteğini esirgemeyen Veteriner Hekim Serkan EROL'a, İstatistik Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. İbrahim KILIÇ'a ve Araş. Gör. İlkay DOĞAN'a, değerli hocalarım Prof. Dr. Sefa ÇELİK ve Doç. Dr. Sinan İNCE'ye, sevgili arkadaşım Araş. Gör. Damla ARSLAN ACARÖZ'e teşekkür ederim. Doktora süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme, her zaman yanımda olan Nazike İŞBİLİR, Ahmet Utku ŞİMŞEK ve Nihal ZEMHERİ'ye, tez çalışmamı destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Şekiller.....	vii
Tablolar.....	ix
1.GİRİŞ	1
1.1. Nonilfenol.....	3
1.1.1. NF'nin Genel Özellikleri.....	3
1.1.2. NF'nin Üretimi, Kullanım Alanı ve Çevresel Durumu.....	7
1.1.3. NF'nin Üreme Fizyolojisine Etkisi.....	10
1.1.4. NF'nin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi.....	12
1.1.5. NF'nin Toksik Etkisi.....	14
1.1.6. NF ve Apoptozis İlişkisi.....	16
1.2. NF ve C Vitaminin <i>in vivo</i> Etkileşimi.....	18
1.3. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisi.....	19
1.4. NF'nin Geno toksik Etkisini Belirlemek İçin Üzerinde Çalışılan Genler.....	23
1.4.1. <i>β-aktin</i>	23
1.4.2. <i>Kaspaz-3</i>	24
1.4.3. <i>Bcl-2</i>	25
1.4.4. <i>Bcl-XL</i>	26
1.4.5. <i>p53</i>	27
1.4.6. <i>Tnf-α</i>	28
1.5. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin Revers- Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Tekniği Kullanılarak Tespiti.....	30
1.6. Tezin Amacı.....	32

2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	34
2.1. GEREÇ.....	34
2.1.1. Hayvan Materyali.....	34
2.1.2. Deney Düzenegi.....	34
2.1.3. Doku Örneklerinin Alınması.....	35
2.2. YÖNTEM.....	35
2.2.1. RNA İzolasyonu.....	35
2.2.1.1.RNA'ların Kalite Kontrolü.....	36
2.2.1.2. DNaz Uygulaması.....	36
2.2.2. cDNA Eldesi.....	36
2.2.3. Primer Tasarımı.....	37
2.2.4. Real-time PCR.....	37
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	39
2.2.6. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	39
2.2.7. İstatistiksel Analiz.....	40
3. BULGULAR.....	41
3.1. RNA Konsantrasyonu ve Kalitesi.....	41
3.2. NF'nin <i>Kaspaz-3</i> Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	41
3.3. NF'nin <i>Bcl-2</i> Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	47
3.4. NF'nin <i>Bcl-XL</i> Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	52
3.5. NF'nin <i>p53</i> Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	57
3.6.NF'nin <i>Tnf-α</i> Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi.....	62
4. TARTIŞMA.....	67
5. SONUÇ.....	74
ÖZET.....	76
ABSTRACT.....	77
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

AF	Alkilfenol
AFE	Alkilfenol Etoksilat
BFA	Bisfenol A
bç	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
Ct	Eşik devri
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dk	Dakika
dNTP	Dezoksiribonükleotittrifosfat
g	Dakika başına düşen devir sayısı
g	Gram
g/L	Gram/Litre
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrojenaz
<i>in vitro</i>	Laboratuvar ortamında
<i>in vivo</i>	Canlı ortamda
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	MiliMolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
°C	Santigrad derece
NF	Nonilfenol
NFE	Nonilfenol Etoksilat
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OF	Oktilfenol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
s	Saniye
TAE	Tris asetik asit etilen diamin tetra asetik asit
Tm	Erime sıcaklığı

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil.1.1. NF'nin Östrojenik Etkisi.....	5
Şekil 1.2. DNA'ya bağlı boya (SYBR Green I).....	30
Şekil 3.1. Dişi ratların beyin dokusundaki <i>kaspaz-3</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	42
Şekil 3.2. Dişi ratların karaciğer dokusundaki <i>kaspaz-3</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	43
Şekil 3.3. Erkek ratların beyin dokusundaki <i>kaspaz-3</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	44
Şekil 3.4. Erkek ratların karaciğer dokusundaki <i>kaspaz-3</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	45
Şekil 3.5. Dişi ratların beyin dokusundaki <i>bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	47
Şekil 3.6. Dişi ratların karaciğer dokusundaki <i>bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	48
Şekil 3.7. Erkek ratların beyin dokusundaki <i>bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	49
Şekil 3.8. Erkek ratların karaciğer dokusundaki <i>bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	50
Şekil 3.9. Dişi ratların beyin dokusundaki <i>bcl-XL</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	52
Şekil 3.10. Dişi ratların karaciğer dokusundaki <i>bcl-XL</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	53
Şekil 3.11. Erkek ratların beyin dokusundaki <i>bcl-XL</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	54
Şekil 3.12. Erkek ratların karaciğer dokusundaki <i>bcl-XL</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	55
Şekil 3.13. Dişi ratların beyin dokusundaki <i>p53</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	57
Şekil 3.14. Dişi ratların karaciğer dokusundaki <i>p53</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	58

Şekil 3.15. Erkek ratların beyin dokusundaki <i>p53</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	59
Şekil 3.16. Erkek ratların karaciğer dokusundaki <i>p53</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	60
Şekil 3.17. Dişi ratların beyin dokusundaki <i>tnf-α</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	62
Şekil 3.18. Dişi ratların karaciğer dokusundaki <i>tnf-α</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	63
Şekil 3.19. Erkek ratların beyin dokusundaki <i>tnf-α</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	64
Şekil 3.20. Erkek ratların karaciğer dokusundaki <i>tnf-α</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	65

TABLolar

	Sayfa
Tablo 1.1. NF'nin kimyasal özellikleri.....	3
Tablo 2.1. Deney hayvan grupları ve deney düzeni.....	35
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizileri.....	37
Tablo 2.3. Çalışılan genlere ait PCR koşulları.....	39
Tablo 3.1. Cinsiyete ve dokulara göre izole edilen ortalama RNA miktarları..	41
Tablo 3.2. Tüm deney gruplarındaki <i>kaspaz-3</i> mRNA ekspresyon düzeyleri..	46
Tablo 3.3. <i>Kaspaz-3</i> 'ün genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması.....	46
Tablo 3.4. Tüm deney gruplarındaki <i>bcl-2</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	51
Tablo 3.5. <i>Bcl-2</i> 'nin genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması..	51
Tablo 3.6. Tüm deney gruplarındaki <i>bcl-XL</i> mRNA ekspresyon düzeyleri....	56
Tablo 3.7. <i>Bcl-XL</i> 'nin genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması.....	56
Tablo 3.8. Tüm deney gruplarındaki <i>p53</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	61
Tablo 3.9. <i>p53</i> 'ün genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması....	61
Tablo 3.10. Tüm deney gruplarındaki <i>tnf-α</i> mRNA ekspresyon düzeyleri.....	66
Tablo 3.11. <i>Tnf-α</i> 'nın genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması.....	66

1. GİRİŞ

Bilim ve teknolojinin ilerlemesi, insan hayatını önemli ölçüde kolaylaştırmaktadır. Ancak bu ilerleme bazı olumsuz gelişmelere de sebep olmaktadır. Bunların başında ise çevre kirliliği gelmektedir. Çevrede bulunan doğal ya da yapay kimyasal maddeler doğadaki insan dahil tüm canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Bu maddeler doğal kimyasallar, plastikler, gıda katkı maddeleri, deterjanlar, pestisitler, kozmetik ve ilaç gibi kimyasallar, su ve havadaki kirleticiler, sigara dumanı, alkoller, steroller ve fenolikler gibi bileşiklerdir. Çevresel kirleticilerin birçoğunun insan sağlığı üzerine olası etkileri giderek artmakta ve bu artış tartışmalara neden olmaktadır. Bu kirleticilerin bazıları canlıların endokrin sistemini olumsuz yönde etkilemektedir. Endokrin bozucu kimyasallar özellikle deterjanlarda, böcek ilaçlarında ve endüstriyel ürünlerde bulunmaktadır. Bu kimyasal maddeler; stiren, 1,3-butadien, melamin, formaldehit, vinil klorür, akrilamid, bisfenol A (BFA) ve nonilfenol (NF) gibi bileşiklerdir (Çetinkaya, 2009; Durusoy ve Karababa, 2011).

Ksenoöstrojenler olarak adlandırılan bu kimyasalların çoğu ve bunların parçalanma ürünleri mutajenik, östrojenik, toksik veya karsinojenik etki gösterebilmekte ve çevreden çeşitli yollarla alınan bu maddeler doku ve organlarda birikebilmektedir (Paxeus ve ark., 1992; Toppari ve ark., 1996).

Onkogenler ve tümör supresörlerle ilişkili olan genlerdeki mutasyona neden olan kimyasallar insanlar için genellikle karsinojeniktir ve kansere neden olmaktadır. İnsanlar DNA'ya zarar veren bu kimyasallarla sürekli kontakt halindedir (Synder ve Champness, 2007). Bu nedenle, çevremizde sayıları milyonları bulan ve biyolojik etkileri bilinmeyen kimyasal maddelerin çoğunun günlük kullanımda yer alması, test edilmelerini gerekli kılmaktadır (Forman ve Ames, 1991).

Ksenoöstrojenler üreme ve gelişmede görevli östrojen, progesteron, androjen ve diğer hormonların metabolik faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Ksenoöstrojenlerin bir kısmı hormon reseptör bölgelerine bağlanarak hormon gibi

davranmakta, bir kısmı ise doğal hormonun spesifik reseptör bölgesine bağlanmasını engelleme şeklinde anti-hormonal etki göstermektedir. Ksenoöstrojenik kimyasalların gösterdikleri bu hormonal veya anti-hormonal tepkiler endokrin sistemin işleyişini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Carney ve ark., 1997; Cook ve ark., 1997; Bolger ve ark., 1998).

Endokrin sistem; kan şekerinin ayarlanması ile pankreastan insülinin salınması, ovaryum ve testisten salınan eşeyssel hormonlarla büyüme ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi, böbrek üstü bezlerden salınan tiroksin ve kortizon gibi hormonlar ile metabolizmanın düzenlenmesi gibi vücutta geniş biyolojik fonksiyonları kontrol etmektedir (Yeşilkaya, 2008).

Endokrin yıkıcı kimyasallardan biri olan NF, özellikle endokrin sistem tarafından sentezlenen endojen kimyasalların aktivitesini değiştirerek östrojen reseptörleri ile reaksiyona girip östrojen hormonunu taklit etmektedir (Park ve Kwak, 2010).

Endüstride, tarımda, ev temizliği ile güzellik ürünlerinde yaygın olarak kullanılan NF, uzun yarılanma ömrüne sahip olduğu için toksik ajan olarak nitelendirilmektedir. Özellikle yiyeceklerde ve içme sularında en çok bulunan toksikanlardan biridir (Hernandez ve ark., 2006; Balakrishnan ve ark., 2011). Bu nedenle insanlar sudan ve özellikle günlük alınan gıda maddelerinden sürekli olarak NF'ye maruz kalabilmektedir (Chen ve ark., 2008; Jubendradass ve ark., 2012). Ayrıca, omurgalı canlılarda üreme ve endokrin sistem üzerinde östrojenik etkiye sahip olduğu rapor edilen en etkili endokrin yıkıcı kimyasallardan birkaçı arasında sınıflandırılmaktadır (Maeng ve ark., 2005). Farklı organizmalar üzerinde de dişileştirme ve kanser oluşumuna neden olan zararlı etkileri olduğu rapor edilmektedir (Roig ve ark., 2014). Genellikle NF su arıtma tesislerinde uzaklaştırılabilmelerine rağmen, indirgenmiş konsantrasyonlarda atık suların içinde nehir ve akarsulara verilmektedir (Vural ve Duygu, 1992). Genellikle *in vivo* ve *in vitro* hayvan çalışmalarında fazla kullanılmasının nedeni de, bir endokrin yıkıcı

kimyasal olarak tüm canlılar üzerinde tehdit oluşturmasından kaynaklanmaktadır (Riva ve ark., 2010).

Son yıllarda endüstriyel gelişime bağlı olarak NF'nin büyük bir miktarının sadece dışsal kaynaklardan vücuda alınmadığı, insan endokrin sisteminde de üretilebildiği ortaya konmuştur (Vela-Soria ve ark., 2015). 1980 yılından bu yana zararlı etkileri üzerinde çalışılan NF'nin, hücre ölümü üzerindeki etkisi ve bu etkinin mekanizması belirsizliğini korumaktadır (Yao ve ark., 2007; Choi ve ark., 2011).

En az 20 alt üniteli izomerlerden oluşan NF'nin en çok çalışılan maddelerden biri olmasının nedeni ise, NF'nin östrojen reseptörlerine bağlanabilmesi, üreme ve gelişme boyunca biyolojik değişiklikleri tetiklemesinden kaynaklanmaktadır. Bu değişikliklerin çoğunun, östrojen reseptörlerinin fonksiyonundan kaynaklanan gen ekspresyonundaki değişim nedeniyle meydana gelebileceği düşünülmektedir (Denslow ve ark., 2001; Ying ve ark., 2012).

1.1. Nonilfenol

1.1.1. NF'nin Genel Özellikleri

NF alkil fenollerin alt kümesinden oluşan organik bileşikler ailesindedir. Belirli kimyasal özelliklere sahip NF'nin sudaki çözünürlüğü 6 mg/L (pH.7)'dir ve etanol ve dimetil-sülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. NF'nin kimyasal özellikleri (Soares ve ark., 2008)

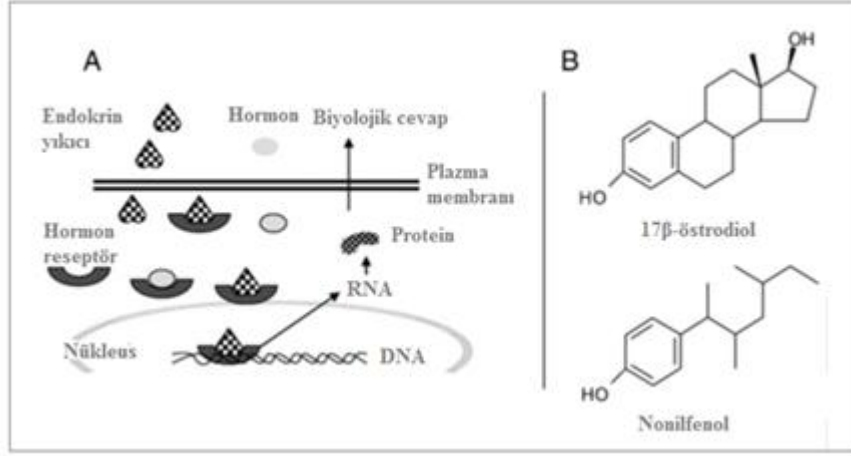
Moleküler formül	$C_{15}H_{24}O$
Moleküler ağırlığı	220,34 g/mol
25°C'deki yoğunluğu	0,952 g/cm ³
Sudaki çözünürlüğü	4,9 mg/l
Bölüm katsayısı (log K_{ow})	4,48
25°C'deki buhar basıncı	$2,07 \cdot 10^{-2}$ Pa

AFE (Alkilfenol Etoksilat), temizlik ürünleri, boya, ot ve böcek ilaçları gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşenleridir. AFE'ler biyolojik olarak kolay parçalanma özelliğine sahiptir ve parçalanma ürünleri biyodegradasyona karşı dirençli yapılardır. (Warhurst, 1995). Endüstride kullanılan NF, 4-NF'nin %86-94'ünden oluşan kompleks bir karışımdır (Zhang ve ark., 2012).

NF, Avrupa Birliği Su Çevre Yönetmeliği'nin öncelikli maddeleri arasındadır. Bu maddenin çevredeki varlığı insan sağlığını her gün artan oranda tehdit etmektedir. Özellikle bebeklerin çevresel kimyasalların hormonal etkilerine yetişkinlerden daha hassas olduğu ortaya konmuştur. Almanya'da OF (oktilfenol), tüm yiyeceklerin sadece %80'inde görülürken, NF'nin her yerde var olan gıda maddelerinde yaygın olarak görülebildiği rapor edilmektedir (Raecker ve ark., 2011).

Amerika'da 2000 yılında yaklaşık 128 bin ton üretilen ve etoksilatların yıkım ürünlerinden biri olan NF'nin, hidrofobik olduğu, organik materyallerce zengin sedimentlerde kolayca birikebildiği, yüksek yağ içerikli dokularda yoğunlaştığı ve haliçlerdeki çamur tabakası gibi oksijensiz çevrelerde yıllarca süregeldiği rapor edilmektedir (Diehl, 2012).

NF ve 17 β -östradiol kimyasal yapıları açısından çok benzerlik gösteren moleküllerdir (Şekil 1.1.B). Bu nedenle; NF'nin diğer BFA gibi östrojenik kimyasallardan daha güçlü bir östrojenik aktiviteye sahip olduğu için dişilik hormonunun bütün fonksiyonlarını taklit edebildiği rapor edilmektedir. İşcan ve ark., (2005) NF'nin östrojenik aktivitesinin balıklarda vitellojenin (Vtg) (yumurta oluşumundaki öncü protein) artışı ile birlikte ilişkilendirildiğini bildirmişlerdir.



Şekil.1.1. (A) NF ve 17β-östrodiol'ün östrojen reseptörü üzerinden hücredeki etki mekanizmaları (B) 17β-östrodiol ve dallanmış NF'nin kimyasal yapısı (Soares ve ark., 2008).

NF'nin, özellikle dişi balıklarda fertilitiyi etkilediği, NF'ye maruziyetten 28 gün sonra balıklarda üremede azalmaya ve testis yapısında bozukluğa neden olduğu ve yüksek konsantrasyonlardaki NF'nin etkisinin, dişi balıklarda fertilitiyi azalttığı bildirilmiştir (Kinnberg ve ark., 2000).

Sabbieti ve ark., (2011) NF'nin, apoptozisi tetiklediğini ve apoptotik etkisinin osteoblastlarda 17β-östrodiol'den kaynaklandığını, aynı zamanda da AF'lerin östrojen reseptörleri ile ilişkili 17β-östrodiol'un ekspresyonuna engel olduğunu bildirmişlerdir (Sabbieti ve ark., 2011).

NF'nin *Crassostrea gigas* larva gelişimindeki etkisini incelemek için larvalar 0,1; 1; 10; 100; 1000 ve 10000 µg/L konsantrasyon aralığında NF'ye maruz bırakılmıştır. En yüksek dozda verilen NF'nin çevresel gerçek konsantrasyonlarının *C.gigas* larva gelişimini geciktirdiği ve kabuk deformasyonunun artmasına neden olduğu Nice ve ark., (2000) tarafından bildirilmiştir.

Hossaini ve ark., (2001) NF'nin potansiyel üreme toksisitesini belirlenmek için ratlara 11. günden 18. güne kadar 3, 15 ve 75 mg/kg/gün dozlarda NF ve 30 mg/kg/gün dozunda dietilstilbestrol (DES) verilmiştir. Erkek yavruların yeni doğan ağırlıkları, vücut ağırlıkları ve 110 günlük hareketli sperm yüzdesi ve sağ

epididimisin mutlak ağırlığının NF verilen grupta azaldığı ve erkekler üzerinde NF'nin 15 ve 75 mg/kg/gün dozlarının üreme gelişimindeki etkisinin özellikle epididimal ağırlıktaki azalmayla ilişkili olduğu bildirilmiştir.

NF'nin, merkezi sinir sistemini etkileyerek homeostazisi bozabildiği ve normal beyin fonksiyonlarını etkileyebildiği (Mao ve ark., 2008), beyin gibi yağ dokusunun fazla olduğu dokularda birikebildiği ve yıkımı zor olduğu için vücutta uzun süre kalarak zararlı etkilere sebep olduğu bildirilmiştir (Solomon ve Schettler, 2000). Ishido ve ark., (2005) ratlardaki davranışsal ve hücrel cevapları belirlemek için yaptıkları çalışmada; 5 gün boyunca NF'ye maruz kalan yaşlı erkek ratlarda NF'nin hiperaktiviteye neden olduğunu bildirmişlerdir.

Chen ve ark., (2009) çevresel ksenoöstrojenik kimyasalların (obesogen) normal gelişim ile adipogenez (organizmadaki yağ oluşumu) kontrolü arasındaki homeostatik ve enerji dengesi arasındaki ilişkiyi vurgulamışlardır. Endokrin yıkıcı kimyasallara maruziyet arttıkça, obezitede artış meydana geldiği bildirilmiştir. Obesogenlere maruziyetin artması ile obeziteye eğilimin azalması ve/veya engellenmesi için yeni yaklaşımlara ve daha fazla araştırmaya gerek duyulduğu da rapor edilmiştir.

Doğadaki NF'nin direk oluşumu bilinmemekte, fakat doğadaki NF varlığının sadece insanların ihtiyaçlarına bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. NF'nin, tekstil, metal işleme, endüstriyel ve çamaşır temizlemeden açığa çıkan AFE'nin degradasyonu yoluyla üretilebildiği, fakat serbest haldeki NF'nin miktarı üzerinde az veri bulunduğu bildirilmiştir (Kortner ve ark., 2009).

Riva ve ark., (2010)'nın yaptığı çalışmada tatlı su midyesi *Dreissena polymorpha*'da NF'nin gücü araştırılmıştır. NF'ye maruz kalan midyelerde NF'nin vücutta biriktiği, 17 β -östrodiol ve testosteron seviyelerinin tamamıyla düştüğü vurgulanmış ve NF'nin, *D.polymorpha*'da antioksidan savunma mekanizmasına engel olduğu bildirilmiştir. Hormon seviyesini değiştiren NF'nin mekanizması henüz tam anlamıyla bilinmemekte ve daha derin araştırmalara gerek duyulmaktadır.

1.1.2. NF'nin Üretimi, Kullanım Alanı ve Çevresel Durumu

Çeşitli endüstrilerde kullanılan NF'nin özellikle nehirlerde, haliçlerde, diğer sucul çevrelerde, atıksu boşaltım yerlerinde ve açık deniz petrol platformlarının yakınlığında yaygın olarak bulunduğu (Baldwin ve ark., 2005) ve doğada hem hayvansal hem de bitkisel planktonlarda belirlenen NF konsantrasyonunun 29 ile 129 µg/L arasında değiştiği bildirilmiştir (Hense ve ark., 2005).

Uğuz ve ark. (2003) Türkiye'de bulunan Sakarya Nehri ve Değirmen Deresi üzerinden toplanan su örneklerinde AFE'ye rastlamamış, fakat sediment ve balık örneklerinde AFE'ye rastlamışlardır. AFE'lerin balık dokularında ölçülmesi, nehirlerimizde AFE varlığını göstermekte ve NF'nin, balıkların karaciğerinde patolojik ve biyokimyasal bozukluklara neden olduğu rapor edilmektedir (İşcan ve ark., 2001; Uğuz ve ark., 2003b). Ayrıca, NF'nin gökkuşuğu alabalığının karaciğer hücrelerinde östrojen etkisine benzer şekilde, glikojen miktarında azalma ve nükleik asit miktarında bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Çakmak ve ark., 2003).

Türkiye'de bulunan Sakarya Nehri ve Değirmen Deresi'nde yapılan çalışmada, NF düzeyinin çökeltilerde 3,15 ve 4,46 µg/g miktarları arasında iken, balıklardan alınan doku örneklerinde 0,1 ve 0,6 µg/g miktarları arasında olduğu, bu belirlenen AFE seviyesinin de Avrupa ile paralellik gösterdiği ancak Amerika'dan daha düşük olduğu bildirilmiştir (Uğuz ve ark., 2003a,b).

Lu ve ark., (2007) tarafından, Tayvan'ın kuzey, orta ve güney bölgelerinde yaygın olarak tüketilen 25 farklı gıda maddesinden 318 örnek analiz edilmiş ve NF'nin ortalama günlük alımının 28,04±25,32 µg/gün olduğu ve bu değer Almanya ile Yeni Zelanda'ya göre sırasıyla 4 ve 8,5 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Tayvan'da, NF alımının en önemli kaynaklarından birinin pirinç olduğu da bildirilmektedir.

Han nehrindeki NF'nin miktarını belirlemek için su, asılmış partikül ve sediment örnekleri yaz, sonbahar ve kış ayları boyunca analiz edilmiş, NF konsantrasyonlarının suda 23,2-187,6 ng/L, asılmış partikülde 6,8-190,8 ng/L ve sedimentte 25,4-932,0 ng/L olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda, suda ve asılmış partiküllerde soğuk sezondaki NF konsantrasyonunun, sıcak sezondaki NF konsantrasyonundan daha fazla olduğu, sudaki azalan sıcaklık ile asılmış partikül fazındaki NF yüzdesinin 67'den 28'e düştüğü ve sedimentteki konsantrasyonlarda mevsimsel bir farklılığın olmadığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2004).

Yapılan bir araştırmada yetişkin erkek ve dişi ratlar 25 ppm oranında NF içerikli musluk suyuna maruz bırakılmış ve NF'nin karaciğere etkisi değerlendirilmiştir. NF'ye maruz kalan ratların karaciğerinde iki çekirdekli karaciğer gözesi yüzdelerinin artmasıyla apoptotik etki gözlemlendiği bildirilmiştir (Hernández ve ark., 2007).

Lian ve ark.,'nın (2009) yaptığı çalışmada; atık su uygulanan dört çeşit bitkinin davranışları araştırılmış ve konsantrasyonlara bağlı olarak NF'nin etkisinin mevsimlerle de ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bitkilerde NF birikiminin yaz aylarında daha fazla iken, yağmurlu havalarda daha düşük olduğu, karboksillenmiş nonilfenol etoksilatlarının atıklarda en fazla bulunan kimyasal iken, NF'nin lağım pisliği yoluyla çevrede var olan bir kimyasal olduğu rapor edilmiştir.

Ademollo ve ark.,'nın (2008) yaptığı çalışmada İtalyan kadınların sütündeki NF'nin varlığı araştırılmış ve 32 ng/mL konsantrasyonla en yüksek seviyede bulunan bir kontaminant olduğu ortaya konmuştur. Çalışmada araştırılan grupların sütteki NF seviyelerinin deniz ürünleri tüketimiyle doğru orantılı olduğu, anne sütü örneklerinde bulunan konsantrasyonlara bağlı olarak, maksimum günlük NF alımının Danimarka Güvenlik ve Toksikoloji Enstitüsü tarafından 5µg/kg vücut kütle, tolere edilen günlük alım miktarının ise 3,94 µg/kg/gün olduğu rapor edilmiştir.

Salgueiro-González ve ark., (2013)'nin yaptığı çalışmada; farklı tipteki su örneklerindeki AFE miktarı belirlenmiştir. İspanya'nın kuzeybatısında deniz

suyundan alınan örneklerde 0,13 µg/L, yüzey suyundaki örneklerde 0,12-0,19 µg/L NF varlığına rastlandığı, en yüksek konsantrasyonun ise içme suyunda (0,25 µg/L) olduğu bildirilmiştir.

Diana ve Dimitra (2011)'nin yaptığı çalışmada; şişe sularındaki BFA, NF ve OF bileşiklerinin varlığı araştırılmıştır. Kötü depolama koşulları altındaki şişe sularındaki bileşiklerin varlığı 15 ve 30 gün açık hava koşullarında kaldıktan sonra araştırılmıştır. Sadece şişe sularında yüksek BFA konsantrasyonları gözlenirken diğer bileşiklere rastlanmadığı, bu nedenle, şişe suyu tüketim yoluyla bileşiklere maruziyetin çok düşük olduğu bildirilmiştir.

Gyllenhammar ve ark., (2012)'nin yaptığı çalışmada; yiyeceklerle alınan NF ve BFA'nın kan serumundaki miktarı araştırılmıştır. Meyve, tahıl ürünleri, sebzeler ve patates gibi yiyeceklerde NF'nin bulunma sınırı 20 ng/g taze ağırlık seviyesindeyken, balık, et, patates ve süt ürünleri gibi yiyeceklerde BFA'nın bulunma sınırı 2 ng/g taze ağırlık olarak bulunmuştur. Kişi başına tahmini ortalama tüketim miktarınının 27 µg NF/gün ve 3,9 µg BFA/gün olduğu, bu nedenle BFA ve NF'ye sürekli bir maruziyet olduğu bildirilmiştir. Katılımcılar tarafından yapılan anket çalışmasında meyve ve sebze tüketiminin fazla olması ile NF ve BFA'nın alım miktarınının doğru orantılı olduğu rapor edilmektedir.

Tayvan'daki 16 önemli nehirden alınan su ve sedimentlerdeki NF ile BFA konsantrasyonları, su da sırasıyla 0,02-3,94 ve 0,01-4,65 µg/L; sedimentte ise 6,59-47.797,69 ve 0.37-491,54 µg/kg aralığında olduğu rapor edilmiştir. Suda ve sedimentlerdeki NF ve BFA'nın yüksek seviyeleri endüstriyel ve toplumsal alan yakınlarındaki bölgelerde daha fazla ölçüldüğü rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2013).

Li ve ark., (2013)'nin yaptığı çalışmada; 3-24 yaş grupları arasındaki 287 kişiden alınan idrar örneklerinde NF ve BFA seviyeleri araştırılmıştır. NF ve BFA'nın oranları sırasıyla 3,8 ve 0,5 ng/L sınırlarında olduğu belirlenmiştir. Oranlar yaşa, cinsiyete ve içme suyuna göre hesaplanmış ve erkeklerin dişilerden daha fazla NF ve BFA konsantrasyonlarını vücutlarında depoladıkları bildirilmiştir.

NF'nin insan kordon kanında ve anne sütünde belirlenmesi, gelişim dönemindeki NF'ye maruziyeti kaçınılamaz hale getirdiği ve hiperadrenalizme neden olabildiği ve dışı ratlara içme suyuyla NF (2 µg/mL) gebelik ve emzirme süresince uygulanmış gelişimsel süreçte de bireyler üzerindeki NF'nin etkisinin uzun sürede kendini gösterebildiği rapor edilmiştir (Chang ve ark. 2014).

Kuzey Carolina ve Ohio'da 1,5-5 yaş aralığındaki çocuk ve yetişkinler üzerinde yapılan bir çalışmada (Wilson ve ark., 2007); hava, yiyecek ve içecek, ev tozu gibi etkenler göz önüne alınarak katılımcıların el yüzeyleri ve idrarları 48 saatlik periyodlarla örneklenmiştir. Solunumla ve yiyeceklerle alınan fenollerin konsantrasyonları ölçülerek potansiyel emilim dozları tahmin edilmiş ve NF'nin herhangi bir ortamdaki ölçülebilen miktarının, toplam miktarının %11'inden daha az olduğu rapor edilmiştir.

Niu ve ark.,'nın (2015) Çin'de yaptığı çalışmada yiyecek örneklerindeki BFA ve NF konsantrasyonları ölçülmüş, BFA ve NF miktarlarının sırasıyla 20 ng/kg'dan 267 µg/kg ve 30 ng/kg'dan 1268 µg/kg arasında değiştiği ve günlük alınan diğer tüm yiyeceklere oranla en fazla NF alım kaynağının süt olduğu bildirilmiştir.

1.1.3. NF'nin Üreme Fizyolojisine Etkisi

NF, BFA ve 17β-östrodiol'un sucul çevre için model hayvan olan *Xenopus laevis*'in embriyo gelişimi üzerinde etkileri araştırılmıştır. Embriyolarda, kısa vücut uzunluğu, normalden küçükbaşlılık, eğrilik, ödem ve anormal mide kıvrılması 96 saat 20 µM NF ve BFA ve 10 µM 17β-östrodiol uygulamasıyla uyarıldığı görülmüştür. Özellikle gelişimin erken dönemlerinde BFA, geç dönemlerinde ise NF'nin etkili olduğu rapor edilmektedir (Sone ve ark., 2004).

NF'nin 25 ppm ve üzeri dozlarının, erkek ratlarda belirgin bir şekilde dişileşmeye neden olduğu, bunun başlıca nedeninin ise NF'nin testesteron sentezindeki enzimlerin aktivitesini engelleyebilmesinden ve bu mekanizma üzerinde

farklı etkilere sahip olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir (Laurenzana ve ark., 2002).

Han ve ark., (2004) yaptığı çalışmada 50 gün boyunca NF'ye maruz bırakılan erkek ratların karaciğer, böbrek, testis ve epididimis organ ağırlıkları ve sperm sayıları ölçülmüştür. Ratlar 250 mg/kg/gün olarak NF'ye maruz bırakıldığında, epididimisin kesin ve göreceli ağırlığı azalırken, lüteinleyici ve folikül uyarıcı hormonların seviyelerinin de arttığı rapor edilmiştir. TUNEL testine göre de NF konsantrasyonlarına bağlı olarak testislerde apoptotik hücre sayısının arttığı bulunmuştur.

Nice ve ark.,'nın (2005) yaptığı bir çalışmada; NF'nin, *Crassostrea gigas* pasifik istiridyelerinde sperm hareketliliğini etkilediği bulunmuştur. Sperm hareketliliği ve büyüme cinsel olgunluğa erişinceye kadar düzenli aralıklarla izlenmiş ve spermleri hareketli bireylerin sayısında önemli derecede azalma görüldüğü bildirilmiştir. NF'nin sperm motilitesini azalttığı ve akrozom reaksiyonunu tetiklediği ratlarda (Uguz ve ark., 2009), sığırlarda (Lukac ve ark., 2013; Uguz ve ark., 2014a) ve koçlarda (Uğuz ve ark., 2014b) rapor edilmiştir.

Balakrishnan ve ark., (2011) yaptığı çalışmada NF'nin insan plesantasına geçişi değerlendirilmiştir. Çevredeki oranlarıyla ilişkili konsantrasyonlarındaki NF'nin bozulmamış formunun yavaş bir şekilde insan plesantasından geçebildiği rapor edilmiştir.

Roig ve ark., (2014) tarafından NF'nin çevresel konsantrasyonları kullanılarak tavuk embriyo gelişimi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla, NF küçük bir iğne ile yumurta sarısına enjekte edilmiş ve histolojik analizlerde %64,12 oranında lümen içindeki seminifer yüzey alanında bir azalma olduğu belirlenmiştir. NF'nin daha yüksek konsantrasyonları enjekte edildiğinde ise, anormal safra artışı ile karaciğer gelişiminde bozulukların olduğu rapor edilmiştir.

Hamilelik boyunca NF'ye maruz kalan yavru kemirgenlerde adipogenez değişikliği görülmektedir ve gelecek nesillere geçip geçmediği bilinmemektedir. Zhang ve ark., (2014)'nın yaptığı çalışmada, gebe ratlar doğum sonrasında NF'ye maruz bırakıldıktan sonra, serum, kolesterol ve leptin seviyeleri önemli derecede yüksek bulunurken, yağ hücrelerinin miktar ve boyutunun azaldığı, yağ dokularındaki anahtar düzenleyicilerin gen ekspresyon seviyelerinin de etkilendiği bildirilmiştir. NF'ye perinatal olarak maruz kalan hem dişi hem de erkek yavrularda adipogenez görülmekte ve bu annesel hat boyunca F2 yavrulara geçebildiği rapor edilmektedir.

1.1.4. NF'nin Oksidatif Stres Üzerine Etkisi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen oksijen ve oksijenden türemiş serbest radikallerle meydana gelmekte ve artan hücresel hasarla ilişkilendirilmektedir. ROS ve onların metabolitleri DNA, lipid ve proteinlere saldırı halindedir (Tvrđá ve ark., 2011). Protein, lipid ve DNA içeren hücrelerin tüm bileşiklerindeki hasarlar peroksidazların ve serbest radikallerin üretimi ile toksik etkilere neden olabilmektedir (Dong ve ark., 2014). Tvrđá ve ark., (2011) ROS'un küçük miktarları spermatozoanın birkaç fonksiyonunda gerekli gibi görünse de bunların aşırı miktarda olması spermatozoa kalitesini ve genel dölllenme kapasitesini negatif bir şekilde etkilediğini rapor etmişlerdir.

Oksijensiz solunum yapan organizmalar ROS'un yıkımı ve üretimi arasında karmaşık bir denge oluşturmaktadır. Hücrede ROS özel antioksidan enzimler, yağda eriyebilen düşük moleküler ağırlıklı serbest radikal temizleyiciler ve suyun antioksidan savunma mekanizmasıyla arınmaktadır. Fazla ROS antioksidan savunmaların üstesinden gelebilmekte ve oksidatif strese neden olabildiği bildirilmektedir. Wu ve ark., (2011), sucul sistemdeki NF, BFA ve NF-BFA'nın zebra balık embriyosunda antioksidan cevapları etkileyebildiğini rapor etmişlerdir.

Jubendradass ve ark., (2011)'nin yaptığı bir çalışmada dişi ratlarda NF'nin karbonhidrat metabolizması ve pankreasın oksidatif durumları üzerindeki etkileri araştırılmış ve NF'nin kontrol gruplarına kıyasla plazma glukoz seviyesini azalttığı ve plazma insülin seviyesini ise arttırdığı rapor edilmiştir. NF'nin pankreasta oksidatif strese neden olduğu ve karaciğer glukoz dengesini etkilediği bildirilmiştir.

Chitra ve Mathur, (2004) NF toksisitesi ile ilgili ROS üzerindeki E vitaminin etkisini araştırmışlar ve NF ile E vitamini birlikte uygulandığında rat testislerinin çeşitli hücre içi parçalarında antioksidan enzimlerin aktivitelerinde değişikliğe neden olmadığını, NF'nin kademeli dozlarının ise rat testislerinde antioksidan savunma sisteminin tükenmesine neden olduğunu ve testislerinde oksidatif stresi uyardığını bildirmişlerdir.

NF'nin ROS'u meydana getirdiği ve beyin, testis ve nötrofillerde oksidatif hasarı uyardığı rapor edilmektedir. Fakat, pankreas üzerindeki etkileri henüz net değildir. NF'nin pankreatik β hücrelerinde hücre içi östrojen reseptörleri aracılığıyla insülin salınımını uyardığı bildirilmiştir (Jubendradass ve ark., 2011).

Mao ve ark., (2011)'nin yaptığı çalışmada farelerin zihinsel yeteneği ve antioksidan kapasitesi üzerine NF'nin etkileri değerlendirilmiş ve NF'nin farelerde yeni bilgileri öğrenmek için hafıza fonksiyonlarını ve yeteneğini önemli derecede azalttığı, sürekli yüksek dozda NF'ye maruziyetin de erkek farelerde oksidatif stres oluşumu için bir potansiyel bir risk oluşturduğu ve bilişsel bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir.

Gong ve Han (2006) sertoli hücrelerini 24 saat 10-40 μ M NF'ye maruz bırakarak, testiküler sertoli hücrelerinde oksidatif stres ve toksisitesi değerlendirmiş ve 12 saat NF ile inkübasyon sonrası sertoli hücrelerinde lipid peroksidasyonunu artırdığı, düşük NF konsantrasyonunun ise rat sertoli hücrelerinde oksidatif stresi uyardığı bildirilmiştir.

Aly ve ark., (2012)'nin yaptığı çalışmada dişi üreme organlarının ağırlığı, sperm karakterizasyonu ve epididimis üzerindeki NF'nin etkileri araştırılmış ve NF'nin spermatogenez ve epididimal sperm üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durum oksidan ve antioksidan dengeyi bozmaktadır. Bu nedenle, NF ratların epididimal spermalarında oksidatif strese neden olabilmekte ve hatta sperm geçiş süresini, üremede sperm kalitesini ve doğurganlık potansiyelini etkileyebildiği rapor edilmektedir.

1.1.5. NF'nin Toksik etkisi

NF, NFEO'nun yıkım ürünü olarak sucul çevrede önemli miktarda bulunduğu ve NF'nin özellikle sucul canlı türlerinin çoğunda önemli derecede toksisite gösterdiği bildirilmiştir (Michael ve ark., 1997). Aynı zamanda NF'nin ana yüzey aktif maddesi NFEO'dan daha fazla toksik olduğu William ve ark., (1997) tarafından rapor edilmiştir.

Shelley ve ark., (2012)'nin yaptığı bir çalışmada; biyolojik organizmalarda farklı miktarlardaki NF'nin, immunotoksikolojik etkileri belirlenmiştir. Yavru gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), solvent kontrol (%0,00625, v/v etanol) ve NF'nin (2,3 µg/L ve 18 µg/L) öldücü olmayan dozlarına 4 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Düşük dozdaki NF uygulamasının fizyolojik olarak ölçülebilir bir etkisi gözlenmezken, yüksek orandaki (18 µg/L) NF'ye maruz kalan balıklarda ise fizyolojik değişiklikler ve gen ekspresyon farklılıkları meydana geldiği bildirilmiştir. NF'nin öldürücü olmayan dozlarda immunotoksik olduğu ve vahşi yaşamdaki balık popülasyonunda canlılık için yüksek risk oluşturduğu bildirilmektedir.

Litwa ve ark., (2014)'nin yaptığı çalışmada; fare embriyonik sinir hücreleri üzerinde NF'nin toksik ve apoptotik etkisi altında yatan mekanizma araştırılmıştır. 5 ve 10 µM NF'ye maruz bırakılan fare sinir hücre kültüründe apoptotik ve nörotoksik etkilerin uyarıldığı görülmüştür. 2 ve 7 günlük fare sinir hücre kültürleri 5 ve 10 µM NF'ye karşı savunmasız olabilmektedir. Oysa 12 günlük kültürler sadece NF'nin en

yüksek konsantrasyonuna cevap verebilmektedir. Bu nedenle sinir hücreleri üzerinde yaşa bağlılığın söz konusu olduğunun düşünüldüğü bildirilmiştir.

Ratların serum, karaciğer ve testis dokularında BFA ve NF'nin toksikokinetik etkisi araştırılmıştır (Xiao ve ark., 2006). Serum ve karaciğer dokusunda açık bir şekilde BFA'nın parametrelerinin değişmediği, NF'nin ise farkedilebilir şekilde testislerde BFA'nın toksikokinetik parametrelerini değiştirdiği bildirilmiştir.

Zhang ve ark., (2008)'nin yaptığı çalışmada fare beyinde yangı ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerinde kronik NF uygulamasının etkileri araştırılmıştır. NF 0, 50, 100 ve 200 mg/kg/gün doz aralığında farelere uygulanmıştır. NF'nin en yüksek dozunun (200 mg/kg/gün) beyin korteksindeki çeşitli gen ekspresyonlarını artırdığı, buna göre de NF'nin, fare beyinde nörotoksisiteye neden olan ve kronik yangıyı uyaran bir potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir.

NF'nin toksisite ve östrojenik etkisine ait çok sayıda veri bulunmasına rağmen, bu kimyasalların mutajenik etkisi ile ilgili literatür az sayıdadır. Mutajenik etkinin belirlenmesi amacı ile NF 0,937-4,685 µg/L aralığında 6 farklı konsantrasyonda, OF ise 10-160 µg/L aralığında 5 farklı konsantrasyonda *Salmonella thyphimirium* TA98 ve TA 100 suşları üzerinde (metabolik aktivasyonsuz) test edilmiştir. Tüm NF konsantrasyonlarının toksik olduğu buna rağmen mutajenik etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Boyacıoğlu ve ark., 2007). Ancak, Karadeniz ve ark., (2010)'nin yaptıkları elektrokimyasal çalışmada, NF'nin DNA bazları üzerinde özellikle de guanin bazı üzerinde oksidasyona neden olduğu, DNA'daki baz oksidasyonlarının da mutasyona neden olabileceği rapor edilmektedir (Wei ve Lee, 2002).

1.1.6. NF ve Apoptozis İlişkisi

Tüm canlılar gibi hücrelerde ölmektedir. Hayvanlardaki gelişim boyunca hücre ölümünde bir anlam ve dokular arasında denge vardır ve bu durum apoptozisle ifade edilmektedir (Chipuk ve ark., 2010). Apoptozis veya programlı hücre ölümü organizmanın gelişimi boyunca, sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir süreçtir. Apoptotik yolda görev alan genlerin işlev kaybı ya da kazanımı hücrel iç dengenin bozulmasına yol açarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmekte; yetersiz apoptozis kanser ve otoimmün hastalıklara, hızlandırılmış hücre ölümü ise akut ve dejeneratif birçok hastalığa yol açabilmektedir. Hücre apoptozis için sinyal aldıktan sonra, hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenmektedir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlamakta, hücre iskeleti dağılmakta ve çekirdek zarı yer yer eriyerek çekirdek DNA'sı parçalara ayrılmaktadır. Apoptozisin erken evrelerinde kaspaz proteinleri dağılmaya başlamakta ve aktif olan bu proteinler hücrel birçok substratın kesilmesine hem aracılık etmekte hem de neden olmaktadır (Yıldırım ve ark., 2007).

Apoptozisin iki temel yolağı bulunmaktadır. Bunlar, ölüm reseptör aracılı dış sinyal yolağı veya dışsal yolak ile mitokondri aracılı iç sinyal yolağı veya içsel yolaktır. Apoptozisin en önemli dengeleyicileri sistein, aspartik asit-özgü proteazlar (kaspazlar) ve proteolitik kaskadların katıldığı pro-apoptotik proteinlerdir. Çoğu hücre tipinde apoptozis anti-apoptotik ve pro-apoptotik olarak ikiye ayrılan, *Bcl-2* aile üyeleri tarafından kontrol edilmektedir. Çeşitli koşullar altında *Bcl-2* proteininin aktivitesi kaspaz bölünmesi boyunca düzenlenebilmektedir. Anti-apoptotik ve pro-apoptotik proteinler arasındaki denge kontrol apoptozis tarafından hücrelerin ölmesi ve hayatta kalmasının belirlenmesiyle meydana gelmektedir (Del Puerto ve ark., 2010).

Apoptozis; ultraviyole radyasyon, oksidatif stres ve genotoksik kimyasallar gibi eksojen ve endojen kaynakların tetiklediğı, biyolojik sistemler içinde önemli bir olgudur. Apoptotik yolakların çalışmaması kanser, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar gibi hastalıklara neden olabilmektedir. Son zamanlarda insan sağlığıyla

ilgili apoptozis teşvik edici bileşiklerin gücü, hücrel inflamatuvar yanıtların ve tümör oluşumunu-ilerlemesini etkilemektedir (Rastogi ve Sinha, 2009).

Yao ve ark., (2007)'nin yaptığı çalışmada; Jurkat (insan T-hücre lösemi) kanser hücre hatları 12 ve 24 saat NF'nin 0,1; 1 ve 10 µM dozlarına maruz bırakılmıştır. Artan doza bağlı olarak, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve sayılarının arttığı; mitokondriyal membran potansiyelinin, *kaspaz-8* aktivasyonunun, nükleozom arası DNA fragmantasyonunun azaldığı ve *kaspaz-8*'e bağlı mekanizmalarla Jurkat hücrelerinde apoptozisin uyarıldığı rapor edilmiştir.

Afrika yayın balığı (*Clarias gariepinus*) 0; 0,05; 0,08 ve 0,1 mg/L aralığındaki NF'nin öldürücü olmayan dozlarına maruz bırakılarak apoptozis, eritrosit değişimleri ve kan parametreleri değerleri mikronükleus testi ile değerlendirilmiştir (Mekkawy ve ark., 2011). Kırmızı kan hücreleri, hemoglobin, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, trombositler, beyaz kan hücreleri, lenfositler, bazofiller, monositler gibi kan parametrelerinde azalma ve ortalama parçacık hacminde, hemoglobinlerde, nötrofiller ve eozinofillerde artış görülmüştür. NF'nin kan parametreleriyle ifade edilen çoğu sayı ve şekil kaybına bağlı olarak eritrositlerde genotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir.

Ergün ve ark., (2014)'nin yaptığı çalışmada; NF ve BFA'nın çevresel dozlarının (0,001; 0,1; 1, 10 ve 100 µg NF/ml ve 0,001; 0,1; 1, 10 ve 100 µg BFA/ml) sığırlarda sperm DNA'sına ve oosit olgunlaşmasına etkileri belirlenmiştir. NF'nin 100 µg /ml ve BFA'nın 0,1; 1, 10 ve 100 µg /ml konsantrasyon gruplarının sığır sperm hücrelerinde DNA kırılmalarına neden olduğu, bu nedenle de apoptozise yol açabileceği bildirilmiştir.

1.2. NF ve C Vitaminin *in vivo* Etkileşimi

C vitamini (askorbik asit) periferel kanların çeşitli bileşiklerinde belirlenmiş en önemli antioksidandır ve özellikle kolajen ve bazı hormonların biyosentezi için gerekli bir besindir. Lenfositlerde C vitamini seviyeleri plazmadan 80-100 kat daha fazladır fakat bu seviyeler geçici diyet değişiklikleri ve 24 saatlik dilimlerde değişmektedir. E vitamini ve β -karoten gibi çeşitli moleküller vitamin C'ye benzer antioksidan özelliklere sahiptir ve fakat en çok deneysel çalışmalar C vitamini üzerinde gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Ide ve ark., 2015; Rodríguez-Roque ve ark., 2015).

C vitamini'nin antioksidan özellikleriyle ilgili yapılan birçok çalışmada serbest oksijen radikal üretimini (superoksid, hidroksil ve peroksil radikaller) azalttığı ve eksikliği durumunda testislerde oksidatif strese neden olabileceği bildirilmiştir (Padayatty ve ark., 2003; Aitken ve Roman, 2008).

C vitamini test edilen farklı antioksidanlara göre serbest radikaller ve aktif oksijen türlerine karşı güçlü bir temizleme özelliğine sahiptir. Elektron verici olan C vitamininin oksidatif hasarları azaltabildiği, endotel bozuklukları ve apoptozi önleyebildiği, anti-inflamatuar etki sergileyerek kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltabildiği rapor edilmektedir (El-Ashker ve ark., 2015).

Erkek ratların testis dokusu üzerindeki BFA, NF ve OF; vitamin C'nin oksidatif stres üzerindeki etkileri araştırılmış ve histolojik incelemelerde, diğer gruplara oranla C vitamini uygulanan gruplarda testislerde tıkanıklık alanları, atrofi ve germinal hücre döküntüsü daha fazla görüldüğü rapor edilmiştir. BFA, BFA+C, NF+C ve OF+C uygulanan gruplarda anormal sperm yüzdelerinin arttığı görülmüştür. Sonuç olarak BFA, NF ve OF'nin ratların testislerinde oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu ve C vitamini birlikte uygulandığında da bu hasarı ağırlaştırdığı rapor edilmiştir (Aydoğan ve ark., 2010).

Korkmaz ve ark., (2011)'da Aydoğan ve ark., (2010)'nın yaptığı deney düzenini kullanarak ratların böbrek dokusundaki hasarı bildirmişlerdir. Histolojik incelemelerde, BFA, OF, NF, BFA+C, NF+C ve OP+C vitamini uygulanan gruplarda nekrotik lezyonlar, tıkanıklık ve mononükleer hücre infiltrasyonu ortaya çıkarılmıştır. Sonuç olarak böbrekte de BFA, NF ve OF oksidatif hasar neden olabildiği bulunmuş ve BFA, NF ve OF'nin C vitamini ile birlikte uygulamasıyla erkek ratların böbreklerinde bu hasarı ağırlaştırdığı bildirilmiştir.

1.3. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisi

Biyolojik olarak parçalanabilir kısa zincirli NFEO'ların etilen oksit ünitesinin sayısı ve genotoksitesitesi arasında bir ilişki bulunduğu bildirilmektedir. Fakat, bileşiklerin genotoksitesitesinin tamamıyla bilinmediği düşünülmektedir (Toyooka ve ark., 2012).

Vivacqua ve ark. (2003), BFA ve NF'nin iyonik olmayan yüzey aktif maddesi ürünlerine parçalanarak östrojen reseptör alfa (ER α)'yı aktive ederek östrojen bağımlı gen ekspresyonuna sebep olduklarını ve östrojene duyarlı meme kanseri hücreleri MCF7'nin büyümesini uyardıklarını bildirmişlerdir.

Vetillard ve ark.,'nın (2006) yaptığı çalışmada NF ve 17 β -östrodiol'un genç gökkuşuğu alabalıklarındaki (*Oncorhynchus mykiss*) beyin dokusuna olan etkisi araştırılmıştır. 17 β -östrodiol ve NF'nin yüksek dozlarının uzun izoform ER α mRNA seviyesini artırdığı, fakat kısa izoform ER α transkripsiyon seviyesini etkilemediği rapor edilmiştir. NF'nin beyinde doza bağlı durumlarda yumurtalıkların veya testislerin gelişimini veya etkinliğini uyararak serbest gonadotropin hormon (sGnRH) gen ekspresyonunu da azalttığı bildirilmiştir.

Doğal östrojenler ovaryumda uyarılan hepatik Vtg ve kırılğan yumurta zarı proteini (Zr-protein) gen ekspresyonundan ayrı tutulmaktadır. NF'nin, olgunlaşmamış ve dişi balıklarda Zr-proteini ile hepatik Vtg gen ekspresyonunda değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Meucci ve Arukwe, 2005). Gen

ekspresyonunda görülen bu değişiklik de Vtg'nin, NF'nin östrojenik etkisini belirlemek için seçilmiş biyolojik belirteç olduğu yönündedir (Palermo ve ark., 2012). Ayrıca, An ve ark., (2002), ER α ve çevresel östrojenler tarafından kalbindinD_{9K} (CaBP-9k) mRNA ekspresyonunun düzenlenmesi ve bunların karşılıklı ilişkisi *in vivo* olarak göstermişlerdir. Buna göre, CaBP-9k geninin de çevresel östrojenlere cevap için biyolojik belirteç olma özelliğine sahip olduğu bildirilmektedir.

Dobrzýnska (2014)'nın yaptığı çalışmada, fare somatik hücrelerinde DNA zincir kırılmasındaki NF'nin etkisi araştırılmıştır. Karacięer, akciğer, böbrek, dalak ve kalça kemikleri çıkarılarak Comet analizi yapılarak, organ ve cinsiyete bağlı olarak DNA hasarının farklılık gösterdiği, diři farelerde tüm organlarda, erkek farelerde ise sadece böbrekte hasar olduğu bildirilmiştir. Tüm erkek fareler önemli derecede kemik iliği lenfositlerinde DNA hasarıyla karşı karşıya gelirken, böbrek hücrelerinde DNA hasarı diğer organlara göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir.

Robertson ve McCormick (2012)'e göre, NF uygulanan balıklarda nükleozom düzeneği, hücre siklusu, hücre farklılaşması, mikrotübüllere bağlı hareket, elektron transportu ve strese karşı cevabın arttığı bildirilmiştir.

Memeli hücrelerinde genlerin ekspresyonu; gen ekspresyonunu, protein yapısını, protein fonksiyonunu ve biyolojik düzenleme mekanizmasını anlamak için temel bir araçtır. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi transkripsiyon, RNA işlenmesi, RNA ihracatı, translasyon ve protein yıkım aşamalarından meydana gelmektedir. Çekirdek bu aşamaların her birinde meydana gelen gen ekspresyonunu düzenleme yeteneğine sahiptir. Genler ile proteinler ve onların ekspresyonunu düzenleyen kodlanmayan RNA'lar arasında bir ilişki söz konusudur. Çevresel veya genetik farklı etkenler memeli hücrelerinde ekspresyonun artmasına veya azalmasına neden olabildiği rapor edilmektedir (Kaufman, 2000; Morimoto ve Boerkoel, 2013).

Kanser gibi kompleks hastalıkların moleküler temelini anlamadaki en önemli yaklaşım bireysel genlerin davranışlarını anlamaktır. Bu nedenle değişimin ekspresyon seviyelerini bağımsız olarak tanımlamak önemlidir. Real-time PCR, mikroarray, northern blots ve/veya in situ hibridizasyon yöntemleri ile değişiklikler belirlenebilmektedir (Pollock, 2002; Hedenfalk ve ark., 2002; Kuchipudi ve ark., 2015).

Masu somon balıklarında (*Oncorhynchus masou*) gonadotropin altünite genlerinin (*GTH*) ekspresyonu üzerinde NF'nin etkisi araştırılmıştır. Dişi yavru balıklara 10 veya 50 mg/kg dozlarında 3 gün boyunca NF enjekte edilerek, hipofiz bezi *GTH- α* , folikül uyarıcı hormon- β (*FSH- β*), lüteinleştirici hormon- β (*LH- β*) ve *Vtg* mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmiştir. NF'nin düşük dozunda *GTH- α* , *LH- β* ve *Vtg* mRNA ekspresyon seviyeleri artarken, NF'nin yüksek dozunda ise *FSH- β* mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir. Masu somon balıklarında *GTH* altünite gen ekspresyonu transkripsiyon seviyesinde endokrin yıkıcı kimyasallar tarafından etkilenebilmekte ve genler ksenoöstrojenlerin hipofiz bezini etkiledikleri için belirteç olarak kullanılabilirdiği bildirilmektedir (Maeng ve ark., 2005).

Lee ve ark., (2003, 2004)'nin antijenle uyarılmış fare T-hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, NF'nin T-hücrelerinde alerjik duyarlılığını arttırdığı ve bunun da interleukin-4 (*IL-4*) mRNA ekspresyon seviyelerindeki artışa paralel olarak meydana geldiği bildirilmiştir. Fare ve insanlardaki *IL-4* promoteri, aktive edilmiş T-hücrelerin nükleer faktörü (NF-AT) adı verilen transkripsiyon faktörü için çok sayıda bağlanma bölgesi içermektedir. NF'nin, kalsiyum bağımlı kalsinerin sinyal yolunu uyararak *IL-4* mRNA üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Bu olayın sitoplazmik NF-AT'nin, transkripsiyon faktörünün çekirdeğe sonraki translokasyonu ile defosforilasyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir.

Mochida ve ark., (2004) Japon kayabalığının (*Acanthogobius flavimanus*) beyin ve testis dokularında Ubiquitin karboksi terminal hidrolaz (*UCH*) mRNA ekspresyonu üzerinde endokrin yıkıcı kimyasalların etkilerini araştırmışlardır. Real-

time PCR metodu ile 3 hafta BFA, NF ve 17β -östrodiol maruz bırakılan erkek kayabalıklarının beyin ve testis dokularında *UCH* mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. Nominal 100 ng/L konsantrasyonda 17β -östrodiol maruz kalan balıkların hem testis hem de beyin dokusunda *UCH* mRNA seviyelerinin önemli derecede arttığı ($p<0,001$), testislerde ise önemli derecede azaldığı bildirilmiştir. Endokrin yıkıcı bileşiklerin ya pozitif ya da negatif olarak *UCH* mRNA seviyesini ayarlayabildiği düşünülmektedir.

Mikroarray teknolojisi ile ratların beyinde nöroendokrin ile ilgili olan gen ekspresyon profili üzerinde NF'nin etkileri araştırılmıştır (Xia ve ark., 2008). NF'ye maruz kalan erkek ratların beyinden mRNA ekstrakte edilmiş ve cy3 ve cy5'in farklı bir şekilde ekspresyon seviyelerinin azaldığı görülmüştür. NF'nin perinatal uygulamalarının erkek ratların nöroendokrin fonksiyonlarını altüst edebildiği rapor edilmiştir.

Sung ve Ye (2009)'nin yaptığı çalışmada *Lactobacillus garvieae* karidesler 6 gün boyunca 1, 10 ve 100 µg/karides doz aralığında NF'ye maruz bırakıldıktan sonra sırasıyla ölüm oranını %44-50, %20-24 ve %10-12 olarak belirlenmiştir. NF karideslerin bağışıklık cevabını yükseltebildiği, fakat NF'nin yüksek konsantrasyonlarla oluşturulan etkisinin karideslere zarar verdiği ve patojenlere duyarlılığın arttığı bildirilmiştir.

Sucul çevre üzerinde endokrin yıkıcı kimyasalların potansiyel etkilerine ilişkin küresel bir endişe bulunmaktadır. Endokrin yıkıcı kimyasallar tarafından uyarılan östrojen ilişkili reseptör (*ERR*) genlerinin sucul çevrede yaşayan sinek türündeki (*Chironomus riparius*) ekspresyonu araştırılmıştır (Park ve ark., 2010). Farklı yaşama koşullarına bağlı olarak 24 saat NF'ye maruz bırakılan erkek sineklerde *ERR* mRNA ekspresyonunun önemli derecede arttığı rapor edilmiştir.

Fare sertoli hücrelerinde salgı fonksiyonu ve hücre reseptörlerinin ekspresyonu üzerinde NF'nin etkisi araştırılmıştır (Liu ve ark., 2014). NF ile muamele edilmiş TM4 hücrelerinde nitrik oksit üretimi ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz inhibitör

(*iNOS*) mRNA ekspresyonu azalırken ve sitokin seviyelerinde artış olduğu bildirilmiştir. NF'nin hücre reseptörlerinin ekspresyonunu etkilediği ve erkeğe özgü üreme toksisitesi ile ilişkili olan sertoli TM4 hücrelerinin salgı fonksiyonlarında hasara neden olabildiği de rapor edilmiştir.

1.4. NF'nin Geno toksik Etkisini Belirlemek İçin Üzerinde Çalışılan Genler

1.4.1. β -aktin

Aktin, ökaryotik hücrelerde en bol bulunan proteindir ve bazı aktinlerin amino asit dizisi evrim boyunca korunmuştur. Kas tipi (iskelet, kalp, aort tipi düz kas ve mide tipi düz kas aktinler) ve kas tipi olmayan (sitoplazmik p- ve β -aktin) formlardaki en az 6 aktin izoformu omurgalılarda tanımlanmaktadır. Kas tipi aktinler dokuya özgüdür ve kas kasılmasını fonksiyonel olarak yürütmektedir. Sitoplazmik aktinler ise hücrelerin her birinde eksprese olarak, çeşitli hücre fonksiyonlarına katılmaktadır (Ng ve ark., 1985).

β -aktin 43-kDa moleküler ağırlığında ve hemen hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunan, yüksek derecede korunmuş bir proteindir. β -aktin'nin hücre yapılanması ve sinir hücrelerinin farklılaşması gibi birçok hücre içi süreçlere katıldığı rapor edilmiştir (Gilda ve Gomes, 2013). İnsan β -aktin memeli hücre hattında ve transgenik farelerle ilgili genlerin ekspresyonunda geniş bir şekilde kullanılmakta ve β -aktin tüm hücrelerde bolca ifade edildiği bildirilmektedir (Qin ve Gunning, 1997).

Northern blots, dot blots, ribonükleaz koruma analizi, reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ekspresyon seviyelerinin yarı nicel analizi ve son zamanlarda daha çok cDNA dizisinde standartlaştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (*GAPDH*) ve β -aktin gibi “house-keeping” olarak adlandırılan genler standart olarak geniş bir kullanım alanına

sahiptir. Çünkü bu iki proteinin hücre fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için, tüm hücre tiplerinde ve dokularda benzer seviyelerde temel olarak eksprese olduğu bildirilmektedir (Goidin ve ark., 2001).

1.4.2. *Kaspaz-3*

Proteinlerin yapısındaki peptid bağlarının hidrolitik parçalanmasını katalize eden kaspazlar, sistein aspartat özgü proteaz ailesinden ve memeli apoptotik mekanizmasının temel bileşiklerindedir. Bugün için 14 kaspaz insan apoptotik yollardaki mekanizmalarda rol almaktadır. Bunlar arasında *kaspaz-3*, bir ana cellat proteaz olarak kabul edilmektedir. *Kaspaz-3*, 36-kDa moleküler ağırlığında bu ailenin en önemli üyesidir ve sitozolde normal olarak her zaman bulunmaktadır. Apoptozisin ana yürütücüsü olan *kaspaz-3* hücrelerin mitokondriyal zarları arasındaki alanda, apoptozis boyunca aktiftir ve enzimlerin aktif formunu korumaktadır. Yani *kaspaz-3*'ün gen ekspresyonunun artması apoptoz altındaki hücrelerde tanımlanmaktadır (Said ve ark., 2004; Santamaría ve ark., 2005; Reis ve ark., 2007; Song ve ark., 2011; Lini ve ark., 2013).

Yakovlev ve ark., (2010)'na göre; *kaspaz-3* gen ekspresyon seviyeleri sinirsel apoptozisin belirlenmesinde önemli bir etken olduğu düşünülmektedir. *Kaspaz-3* gen ekspresyon seviyesi beyin olgunlaşma sürecinde farkedilebilir bir şekilde azalabildiği bildirilmiştir. İnsan nöroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise (Abarikwu ve ark., 2014), yüzey ve zemin sularında en çok görülen herbisitlerden biri olan atrazin (ATZ)'nin toksik etkisi araştırılmış, sitotoksikite biyoanalizi ile 5–50 µg/mL doz aralığındaki ATZ'nin hücre canlılığını azalttığı, *kaspaz-3* aktivitesinin artmasıyla doğrulandığı rapor edilmiştir. Negishi ve ark., (2002) ksenoöstrojen madde olan BFA ve NF'nin de *kaspaz-3* aktivasyonuna engel olarak makul nöronal hücre ölümünü inhibe ederek normal beyin gelişimini engelleyebildiği bildirilmiştir.

1.4.3. *Bcl-2*

Kanser; onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı inaktivasyon ve apoptotik yolların baskılanması gibi çeşitli genomik olağan üstü durumlarda meydana gelmektedir. Apoptozisin düzenlenmesi hücredeki pro- ve anti-apoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır. Özellikle hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyelere sahip *bcl-2* (B-hücre lenfoma gen-2) gen ailesi bu önemli hücre kararlarını yönetmektedir (Vestin ve ark., 2008).

Bcl-2 aile proteinleri asıl olarak apoptotik yolların kontrolünde ve düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Mao ve ark., 2008). *Bcl-2* aile üyeleri birçok hücrel sistemde apoptozisin düzenlenmesini ya inhibe ederek (*Bcl-2*, *Bcl-XL*, *Bcl-w*, *Bfl-1* ve *Mcl-1*) ya da teşvik ederek (*Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bcl-Xs*, *Bid*, *Bik* ve *Hrk*) hücrede kendini göstermektedir (Sanz ve ark., 2004). *Bcl-2*, çeşitli proteinlerle etkileşim halinde, ağırlıklı olarak hücre zarında, dış mitokondriyal membranda ve hücre içi membranlarla ilişkili 26-kDa moleküler ağırlığında bir proteindir. (Mologni ve ark., 1999). *Bcl-2* mitokondriden sitokrom c'nin salınımını önleyip ve kaspaz yollarını izleyerek apoptotik ölümü engelleyen anti-apoptotik bir proteindir (Mao ve ark., 2008). *Bcl-2* geninin ekspresyonu programlı hücre ölümü ile ilişki olduğu da bildirilmiştir (Oka ve ark., 1996).

Kanauchi ve ark., (2002)'nin yaptığı bir çalışmada iyi ve kötü huylu böbreküstü tümörleri arasındaki *bcl-2* ve *bax* gen ekspresyon farklılıkları belirlenmiş ve normal böbrek üstü dokularda ve iyi huylu böbrek üstü tümörlerde *bcl-2* ve *bax* ekspresyonunun arttığı, *bcl-2* geninin fazla eksprese olması ise prostat, göğüs ve kolorektal gibi çeşitli kanser tiplerinde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Vestin ve ark., 2008).

Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonu ve *bcl-2*'nin aşırı eksprese olması onkogenik özelliklerle birçok tümöre işaret ettiği görülmüştür. Yapılan çalışmalara göre; UV ile uyarılmış apoptoziste *kaspaz-3*'ün aktivasyonu bağlanmaktayken, özellikle *bcl-2* miktarının düşmesine neden olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2007).

Bcl-2'nin ekspresyonu programlı hücre ölümü ve hücrenin hayatta kalmasının baskılanması ile ilişkilidir. *Bcl-2* gen ürününü sadece farklı immunoreaktivitesi embriyonel ve yetişkin kan yenileyici olmayan dokuların immun sistemi tekrar aktive edici olarak değil, aynı zamanda neuroblastomada da rapor edilmekte, fakat *bcl-2* ekspresyon çalışmalarının beyin tümöründe performans göstermediği de bildirilmektedir (Oka ve ark., 1996). Ancak farklılaşmış tümörlerde çoğunlukla *bcl-2* tespit edilmiştir. İnsan meme kanser dokularında *bcl-2*'nin ekspresyonu vakaların %32-85,9'unda rapor edilmektedir. Paralel hücre eksilmesine veya apoptotik dokuların tersine *bcl-2* gen ekspresyonunun değişimi bildirilmektedir (Rostamizadeh ve ark., 2013).

Genel olarak şimdiye kadar anti-apoptotik üye olarak kabul edilen *bcl-2* proteini çeşitli antikanser ajanlar tarafından uyarılan apoptozisten kanser hücrelerini koruduğu da bildirilmiştir (Chen ve ark., 2015).

1.4.4. *Bcl-XL*

Bcl-2 gen ailesi kemoterapik ajanlar, alkol, sıcak şokları gibi çeşitli uyarıcılar tarafından hücre ölümünün uyarılmasını engellemektedir. *Bcl-2*, *bcl-XL*, *bax* ve *bak* gibi *bcl-2* aile üyelerinin heterodimerleşmesi sonucu apoptozisin bağımsız olarak düzenlediği gösterilmektedir. Bu durumun maya hücrelerinde yapılan deneylerle ortaya çıkarıldığı bildirilmiştir. *Bcl-XL*, *bcl-2* aile üyelerinden bağımsız olarak mitokondride apoptotik değişikliklere karşı hücreyi koruduğu, anti-hücre ölüm aktivitesine sahip *bcl-XL*'nin mutant çalışmalarıyla bulunmuştur. Bu nedenle, *bcl-2* aile üyelerinden en azından *bcl-2*, *bcl-XL*, *bax* ve *bak* iki mekanizma olan heterodimerizasyon ve bağımsız aktivite ile apoptotik mitokondriyal değişiklikleri düzenlediği rapor edilmiştir (Tsujiimoto, 2002).

Bcl-2 gen ailesinin anti-apoptotik üyesi olan *bcl-XL*'nin tümör gelişimde ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir. *Bcl-XL* molekülü dış

mitokondriyal membran geçirgenliği durumunu veya stabilizasyonu koruyarak apoptozu inhibe edebilmektedir. *Bcl-XL*'nin mide kanseri, prostat karsinomu, osteosarkom, meme kanseri gibi çeşitli insan kanser türlerinde fazla eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu durumda *bcl-XL* gen ekspresyonunun artmasının veya azalmasının bazı hastalarda bağımsız prognostik belirteç olabileceğini göstermektedir (Yang ve ark., 2011).

Fare öncül kalvaryal osteoblastları (COBs) üzerindeki NF'nin etkileri araştırılmış ve 10^{-5} M ve 10^{-6} M dikkat çeken oranlarında ki NF ile hücreler inkübe edildiğinde osteoblast yaşama yeteneğinin ve *kaspaz 9* ve *3* gen ekspresyonunun azaldığı, *Bax/Bcl-2* gen ekspresyon seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2008). AFE'lerin mitokondriyal bağımlı apoptotik yol aracılığıyla osteoblast ölümünü uyardığı rapor edilmektedir. NF kaynaklı apoptozisin, içsel ve dışsal yollar arasındaki ilişkilere bağlı olduğu gözlenmiş ve apoptotik sinyal yollarında mevcut olan potansiyel gen olarak karakterize edildiği rapor edilmiştir. Aynı zamanda AFE'lerin östrojen reseptör ekspresyonu ile düzenlenen 17β -östrodiol hormon etkilerine engel olduğu da bildirilmiştir (Sabbieti ve ark., 2011).

1.4.5. *p53*

p53 insan kanserlerinde en yaygın olarak görülen mutatik bir gendir ve insan kanserlerinin %50'den daha fazlası *p53* mutasyonlarını içermektedir. Arnold Levine, David Lane ve William Old *p53* genini 1979 yılında keşfetmişler ve bunun ilk onkogen olduğunu öngörmüşlerdir. Fakat takıma 10 yıl sonra Bert Vogelstein ve Ray'ın katılımıyla kolon kanser çalışmalarında *p53*'ün tümör baskılayıcı gen olduğu ortaya çıkmıştır. Son on yılda insan kanserlerindeki *p53*'ün rolünün çeşitli bakış açılarna bağlı olarak yoğun bir şekilde araştırıldığı bildirilmektedir (George ve ark., 2011).

Tümör baskılayıcı gen olarak bilinen *p53*, 53-kDa nükleofosfoprotein olan çok fonksiyonlu bir proteindir. Hücre döngüsü kontrol noktasında, genetik stabilite,

apoptozis ve DNA tamir mekanizmasında çok önemli düzenleyici rol oynayabildiği rapor edilmiştir. İnsan *p53* geninin beş alana sahip olduğu ve merkez DNA'ya bağlı alanda devre dışı *p53* oluşumunun en çok meydana gelen mutasyonlardan biri olduğu ve balıklarda yapılan laboratuvar çalışmalarına göre, çevresel kimyasallara maruz kalma durumunda *p53* geninin uyarıldığını bildirilmiştir (Lee ve ark., 2008).

p53'ün düşük mutasyon oranına sahip rahim ağzı kanserlerinde sık sık etkisiz halde bulunduğu bildirilmektedir. Normal *p53* fonksiyonunun bozulması, tümörlerin başlatılması ve/veya ilerlemesi için bir önkoşul olarak kabul edilmiştir. Transkripsiyon faktör *p53* temel olarak tümör baskılayıcı olarak hedef genin transkripsiyonal düzenlemesi boyunca görev almaktadır. DNA hasarı, hipoksi, beslenmenin tükenmesi ve onkogen aktivasyonu içeren hücre içi ve dışı stres sinyallerine cevap olarak *p53* translasyonu sonrası değişimler boyunca öncü olarak aktive olmakta ve *p53* proteininin hücrede artmasına ve birikmesine neden olmaktadır. Bu hücrel cevaplar boyunca *p53*'ün DNA tamirini kolaylaştırdığı, hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve kanser oluşumuna neden olabileceği bildirilmektedir. Günümüzde *p53* hedef genlerin yüzlercesi tanımlanmıştır. Hücre döngüsünün durması, yaşlılık ve apoptozisin düzenlenmesi bir tümör önleyici olan *p53*'ün fonksiyonunu en iyi şekilde anlamaktan geçtiği rapor edilmiştir (Liang ve ark., 2013).

1.4.6. *Tnf-α*

Tümör nekrozis faktör alfa (*tnf-α*), otoimmün hastalıkların veya çeşitli iltihap türlerindeki hastalık sebeplerinde etkileri bulunan, anti-tümöral özelliklerin bir sonucu olarak isimlendirilen ve tanımlanan başlıca bir proinflamatuvar sitokindir. Kısaca *tnf-α* makrofajlar ve lenfositler gibi immun hücreler tarafından üretilen güçlü bir anti-kanser efektör ve merkezi sinir sisteminde hem yararlı hem de yıkım özellikleri ile en tipik pro-inflamatuar sitokin olarak tanımlanmaktadır (Larmonier ve ark., 2007; Tong ve ark., 2010; Jin ve ark., 2012). *Tnf-α*'nın proliferasyon, yayılma ve tümör hücrelerinde metastazı uyurarak tümörün ilerlemesine aracılık edebildiği

(Kapitanović ve ark., 2014), mitokondriyal kompleks-I aktivitesini değiştirdiği, adozin trifosfat (ATP) seviyelerini azalttığı ve reaktif oksijen türlerin seviyelerini artırdığı rapor edilmektedir (Prajapati ve ark., 2014).

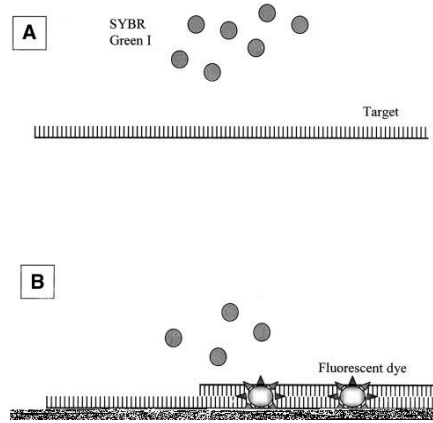
Chen ve ark., (2010)'nın yaptığı hayvan çalışmasında taze ve dondurulmuş periferel kan tek çekirdekli hücreleri veya taze tam kan, *in vitro* uyarılmada ve insan hastalıklarında immünolojik özelliklerin çalışıldığı klinik denemelerde geniş olarak kullanılmaktadır. 4 saat *in vitro* lipopolisakkarid (LPS) uyarılmasında *tnf-α* gen ekspresyon seviyesi değişiklikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak 1 µg/ml ve 10 µg/ml LPS dondurulmuş periferel kan tek çekirdekli hücrelerinde sadece 10 µg/ml LPS uyarılmasından sonra *tnf-α* gen ekspresyon seviyesi hem taze periferel kan tek çekirdekli hücrelerinde hem de taze tam kanda arttığı bildirilmiştir.

Kapitanović ve ark., (2014)'nın yaptığı çalışmada kolon tümörlerinde *tnf-α* mRNA ve protein ekspresyonu üzerinde *tnf-α* tek nükleotit polimorfizmlerin (SNP) etkisi araştırılmıştır. Hastalarda tüm dört *tnf-α* SNP genotiplerindeki dağılım kontrol grubuna kıyasla önemli bir farklılık görülmemiştir. Tümörlerde *tnf-α* mRNA ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmezken, histolojik sınıf 1, 2 ve 3 tümörler arasında *tnf-α* mRNA ekspresyonu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu rapor edilmektedir.

IL-1β, *IL-6* ve *tnf-α* pro-enflamatuar sitokinlerin bastırılması gibi östrojen anti-enflamatuar özellikler deneysel olarak özellikle beyin hasar çalışmalarında rapor edilmektedir (Khaksari ve ark., 2015). Proinflamator sitokinlerin artan seviyesinin özellikle *tnf-α* ve intelökin-6 (*IL-6*) AIDS'li hastaların plazmasında ve dokusunda olduğu bildirilmiştir (Shimizu ve ark., 2005).

1.5. NF'nin Gen Ekspresyon Düzeyi Üzerine Etkisinin Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyon (RT-PCR) Tekniği Kullanılarak Tespiti

Real-time PCR, mRNA'nın ve gen ekspresyon analizlerinin belirlenmesi için güçlü, hassas, ekonomik, güvenilir, hızlı ve yüksek verimli bir teknolojidir. Bu tanı, klinik çalışmalar, patojen belirlenmeler, adli, gıda teknolojisi, kanser miktar ölçümü ve fonksiyonel gen bilimi gibi verimli uygulama alanlarında geniş kullanım alanına sahiptir (Yuan ve ark., 2006). Real-time PCR, revers transkripsiyon polimeraz zincire bağlı olarak floresan süreçte zamana dayalı bir yöntemdir. Bu yöntem tek bir adımda sonuç odaklıdır ve ayrıntılar ile sonuçların açıklanması ile birlikte çalışmaktadır (Bustin et al., 2005; Wong and Medrano, 2005).



Şekil 1.2. DNA'ya bağlı boya (SYBR Green I) (A) solüsyondaki serbest boyalar floresan ışık yaymaz. (B) Kısa sürede SYBR Green çift zincirli DNA'ya bağlanır, hedef floresan oluşur (Giulietti ve ark., 2001).

Real-time PCR genel olarak mutlak ve göreceli ölçüm olmak üzere iki ölçüm stratejisiyle gerçekleştirilmektedir. Mutlak ölçümde her tüpteki mutlak mRNA kopya sayısına uygun dışsal kalibrasyon eğrisi ile kıyaslanarak belirlenmektedir. Mutlak ölçüm miktarını farklı gün ve laboratuvarlar arasındaki ekspresyon verileriyle kıyaslamak daha kolaydır çünkü kalibrasyon eğrisi sabittir ve güvenilirdir. Göreceli ölçüm ise, referans gene karşı hedef genin ekspresyon oranına dayanmaktadır ve gen ekspresyon seviyelerinde fiziksel değişikliklerin belirlenmesinde yeterlidir. Sonuçlar referans gene bağlı olarak standartlaştırılmış metod kullanımına bağlıdır. Bazı

matematiksel modeller tek örnek için göreceli ekspresyon oranının hesaplaması için geliştirilmiştir. Hedef genin göreceli ekspresyon oranı real-time PCR verimliliğine ve kontrole karşı bilinmeyen örneklerin kesişme noktası (Ct) farklarına (Δ) dayalı olarak hesaplanmaktadır. Hedef genin ekspresyonundaki matematiksel modeller düzenli olmayan house-keeping genler gibi genlerden kaynaklanan referans genin ekspresyonu tarafından standartlaştırılmaktadır (Pfaffl ve ark., 2002).

Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması real-time PCR analizinde kullanılan önemli bir aşamadır. Bağlı kantitasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadenme düzeyinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Eğer amplifikasyon verimliliği hem referans gen ve hem hedef gen için 100% olursa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanıldığı bildirilmektedir (Pfaffl, 2001).

Luo ve ark., (2005) kızıl somon balıklarının karaciğer, solungaç, hipofiz bezi ve beyindeki bir genin östrojen reseptör ekspresyonu üzerindeki NF ve 17β -östrodiol'un etkisini ve moleküler mekanizmasını balıklara bir hafta boyunca iki kere NF (15 ve 150 mg/kg/(boy/kilo), 17β -östrodiol (2 mg/kg(boy/kilo) muamelesi araştırmışlardır. Östrojen reseptör- α mRNA'nın kesin miktarı real-time PCR ile tanımlanmış ve östrojen reseptör- α mRNA'nın temel miktarının karaciğer, solungaç ve hipofiz bezinde arttığı rapor edilmiştir. Mart ayında 17β -östrodiol kapsamlı olarak karaciğerdeki miktarın arttığı, Mayıs ayında karaciğer ER α mRNA ekspresyon seviyesinin azaldığı, fakat beyinde önemli bir değişme olmadığı ve NF ve 17β -östrodiol'un, ER α geninin ekspresyonu üzerinde farklı etkilere sahip olduğu rapor edilmektedir (Luo ve ark., 2005).

NFEO'ların östrojenik aktiviteye sahip olmasının özellikle NF'ye bağlı olduğu düşünülmektedir. NF çevrede, tatlı sulara ve balıklarda kalıcıdır. Bu nedenle besin zinciri içinde insanlara ulaşması olağandır. Nitekim NF'nin insanlarda östrojen reseptör sinyal yolağını etkilediği bilinmektedir.

Mutajenik, ksenoöstrojenik ve toksik maddeleri tanımlama kansere neden olma ve gelecek nesillerdeki olumsuz değişmelere neden olabilecek hücre sayısına DNA'ya ve gen düzeyindeki zarar verme potansiyelinden dolayı özellikle önemlidir.

1.6. Tezin Amacı

Endokrin yıkıcı kimyasalların günlük yaşamdaki kullanımları gittikçe artmaktadır. AFE bileşiklerinin yaklaşık %80'inden fazlasını oluşturan NFE, çeşitli maddelerin yapımında katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. NFE'nin birincil bozunma ürünü olan NF'nin, gonadlarda hücre ölümüne neden olduğu ve diğer balık, sürüngen ve memelilerin üreme parametrelerini uyardığı rapor edilmektedir. Endokrin bozucu özelliklere ve östrojenik aktiviteye sahip olan NF, çevrede kalıcı olması ve toksik etkiye sahip olmasından dolayı her zaman önemli bir araştırma konusu olmuştur (Chang ve ark., 2012; Liu ve ark., 2014).

NF'nin çevrede, tatlı sularda ve balıklarda kalıcı olmasından dolayı, besin zinciri içinde insanlara ulaşması olağandır. Nitekim NF'nin östrojen hormonunu taklit edebilmesinden dolayı, NF'nin hücre düzeyindeki olumsuz etkilerinin ortaya konması, rutin tayin yöntemleriyle etkilerinin belirlenmesi ve deney hayvanlarında çeşitli dozlarda deneyler yapılması önem arz etmektedir. Mutajenik, ksenoöstrojenik ve toksik maddeleri tanımlama; kansere ve gelecek nesillerdeki olumsuz değişmelere neden olabileceği düşüncesiyle NF'nin hücre sayısını, DNA'yı ve gen ekspresyon düzeylerini etkileme potansiyelinin belirlenmesi açısından önemlidir.

Ksenoöstrojenlere karşı hücresel cevaplar genelde gen ekspresyonunu düzenleyen ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri gibi fonksiyona sahip östrojen reseptörleri tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle, ksenoöstrojen aktivitesinin moleküler mekanizmasını anlamak için toksikogenomik uygulamalar günden güne önemini artırmaktadır. Ksenoöstrojenik uygulamalardaki gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin, fenotipik olarak belirlenmesi ve bunlarla ilişkili tanımlanan mevcut anahtar adımların birbiriyle örtüştürülmesi gerekmektedir.

Ksenoöstrojenlerin neden olduğu farklılıkların belirlenmesi için gen ekspresyon çalışmalarının geliştirilmesi gereklidir (Moggs, 2005).

Bu çalışmada, şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelenmiş ve NF'nin çevrede ölçülen ve literatürlerde belirtilen miktarlarının solunum yoluyla erkek ve dişi ratlara verilerek, beyin ve karaciğer dokusundan izole edilen RNA'dan cDNA eldesi ile gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu araştırma sonuçları ile NF'nin solunum yoluyla rat dokularındaki verdiği zarara bağlı olarak NF'nin etkilediği *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *p53* ve *tnf- α* genlerinin, dokularda bulunan RNA miktarı üzerindeki etki düzeyini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

2.1.1. Hayvan Materyali

Afyon Kocatepe Üniversitesi, Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan B.30.2.AKU.0.A2.00.00/223 numaralı etik kurul raporu alınarak ve "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" esasları gözetilerek deneysel uygulamalar gerçekleştirildi.

Çalışmada, 2-3 haftalık yaşta 50 erkek ve 50 dişi olmak üzere toplam 100 adet Sprague-Dawley ırkı rat kullanıldı ve bu ratlar Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Deneysel Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Hayvanlar deney süresince 12 saat aydınlık/12 saat karanlık odalarda, $22\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, uygun nemde ve her kafeste 5 adet olacak şekilde polikarbon kafeslerde barındırıldı. Hayvanlara iki haftalık adaptasyon ve deney süresince *ad libitum* standart rat yemi ile su verildi.

2.1.2. Deneysel Düzenegi

Gruplardaki hayvan sayıları, deneysel grupları, uygulama süreleri Tablo 2.1.'deki gibi verilmiştir. Deneysel süresi boyunca, etanolde (Merck, 1.00983.2500) çözdürülen nonilfenol (Sigma-Aldrich, 290858) ve östrojen (17β -östradiol, Sigma, 613967) kafeslerin üzeri plastik örtü ile 1 saat süre kapatıldı ve her rata 1 ml olacak şekilde spreyle sıkılarak solunum yoluyla alınması sağlandı. C vitamini ise (Sigma, 1043003) 100 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde ratların içme sularına katıldı.

Tablo 2.1. Deney hayvan grupları ve deney düzeni

Deney Grupları	Hayvan Sayısı		Deney süresi /gün
	Erkek	Dişi	
Negatif Kontrol	5	5	90
Solvent (etanol) Kontrol	5	5	90
0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	5	5	90
0,1 µg/ml NF	5	5	90
10 µg/ml NF	5	5	90
1000 µg/ml NF	5	5	90
100 µg/ml C vitamini	5	5	90
0,1 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini	5	5	90
10 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini	5	5	90
1000 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini	5	5	90

2.1.3. Doku Örneklerinin Alınması

Deneye 12 hafta sonra son verildi ve ratlar eter anestezisi altında ve servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Ratların karaciğer ve beyin dokuları sıvı azota alınarak donduruldu. Tüm örnekler RNA izolasyonu aşamasına kadar -80°C’de saklandı.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. RNA İzolasyonu

Erkek ve dişi ratlardan alınan karaciğer ve beyin doku örnekleri -80°C’den çıkartıldıktan sonra GeneJet RNA Purifikasyon Kit (Thermo Scientific, K0732) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

RNA eldesi için, 30 mg doku RNaz içermeyen ependorf tüpler içerisinde tartıldı, üzerine 300 µl liziz solüsyonu eklendi ve plastik havan ile tüpün içerisinde parçalandı. Daha sonra bu karışıma 600 µl Proteinaz K (Thermo Scientific, 00107841) solüsyonu eklendi ve 24,5°C’de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 10 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edildi. Süpernatant yeni RNaz içermeyen tüplere aktarıldı ve üzerine 450 µl etanol (%96-100) eklenerek pipetlendi. Bu karışımın 700 µl’si filtreli kolon tüplere aktarılarak 1 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edildi. Tüpün alt kısmı döküldü ve kolona kalan karışım konularak tekrar 1

dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edildi. Daha sonra kolona 700 µl yıkama solüsyonu-I’den eklendi, 1 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edilerek, tüpün altındaki sıvı döküldü. Kolona 600 µl yıkama solüsyonu-II’den eklendi ve 1 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edilerek, tüpün altındaki sıvı döküldü. Tekrar kolona 250µl yıkama solüsyonu-II eklendi, 2 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edildi. Kolon yeni RNaz içermeyen ependorf tüpe aktarıldı ve membranın tam ortasına 100 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 2 dk, 4°C’de ve 12.000 g’de santrifüj edildi. İzole edilen RNA’lar -80°C’de saklandı.

2.2.1.1. RNA’ların Kalite Kontrolü

İzole edilen RNA’ların kalitesi Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazıyla, miktarı ise Qubit RNA Analiz Kiti (Invitrogen, Q32852) kullanılarak Qubit 2.0 floresan spektrofotometre (Invitrogen) cihazı ile ölçüldü.

2.2.1.2. DNaz Uygulaması

RNA’lardan DNA’yı uzaklaştırmak için 1 µg kalıp RNA, 1 µl 10X Reaksiyon Solüsyonu, 1 µl RNaz içermeyen DNaz I (Thermo Scientific #EN0521) eklendi ve DEPC (dietil pirokarbonat) ile toplam hacim 10 µl’ye tamamlanarak 30 dk 37°C ve 10 dk 65°C’de inkübasyona bırakıldı.

2.2.2. cDNA Eldesi

Temizlenen RNA’dan RevertAid H Minus Single Strand cDNA Sentez Kit (Thermo Scientific, #K1632) yardımıyla cDNA sentezi yapıldı. Kit’in protokolüne göre:

DNaz uygulanan 10 µl RNA içeren tüpe, 1 µl 50mM EDTA (etilendiamin tetra asetik asit) eklendi ve 10 dk 65°C’de inkübe edildi. Daha sonra 1 µl Oligo (dT)₁₈

ilave edilerek ve 5 dk 65°C’de bekletildi. Sırasıyla 4 µl 5X reaksiyon solüsyonu, 1 µl RiboLock RNaz inhibitörü, 2 µl 10mM dNTP karışımı ile 1 µl RevertAid H Minus M-MuL V Revers Traskriptaz eklenerek kısa bir santrifüjden sonra 42°C’de 60dk ve 70°C’de 5 dk inkübe edildi. Sentezlenen cDNA’lar kullanılıncaya kadar -80°C’ye kaldırıldı.

2.2.3. Primer Tasarımı

Primer tasarımında NCBI web sitesinden *Rattus norvegicus*’a özgü *β-aktin*, *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL* ve *tnf-α* genlerine ait mRNA dizilerinden ve FastPCR 6.0 (Kalendar ve ark., 2009) bilgisayar paket programından yararlanıldı. Primer dizileri, toplam baz uzunlukları ve gen bankası numaraları Tablo 2.2’de verildi.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan primer dizileri.

Gen	Oligonükleotid dizisi	Ürün boyutu (bp)	Gen Bankası No
<i>β-Aktin</i>	F GAGGGAAATCGTGCGTGACAT	452	NC_005111.4
	R ACATCTGCTGGAAGGTGGACA		
<i>p53</i>	F CGGAGGTCGTGAGACGCTG	220	NC_005109.4
	R CACATGTACTGTAGTGGATGGTGG		
<i>Kaspaz-3</i>	F GAGCACTGGAATGTCATCTCCGCTCTG	286	NC_005115.4
	R TACAGGAAGTCAGCCTCCACCGGTATC		
<i>Bcl-2</i>	F CAGCTGCACCTGACGCCCT	235	NC_005112.4
	R CCCAGCTCCGTTATTCTGGA		
<i>Tnf-α</i>	F AGCCAGGCAGGTTCGGTCCCTC	358	NC_005119.4
	R TTACTGTGCCACCAGCCGAC		
<i>Bcl-XL</i>	F GAACTCTTTCGGGATGGGGTA	150	NC_005102.4
	R CAGAACTACACCAGCCACAGTC		

2.2.4. Real-time PCR

Deney grupları (Tablo 2.1) arasındaki gen ekspresyon düzeylerinde farklılıkları belirlemek amacıyla real-time PCR ve gene özgü primerlerden yararlanıldı. Seçilen genlerin ve housekeeping gen (*β-Aktin*) ekspresyonu, dişi ve erkek olmak üzere 10’ar grup üzerinden karaciğer ve beyin dokularından alınan örnekler LightCycler® 480 II

(Roche Applied Science) real-time PCR cihazında incelendi. Herhangi bir uygulama yapılmayan dişi ve erkek grup kontrol olarak kullanıldı.

Seçilen primerler özgül olmayan bağlanmayı engelleyecek şekilde seçildi. Çalışma kapsamında *β-Aktin*, *p53*, *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL* ve *tnf-α* genlerine özgül primerler sentezlendi. cDNA'lar real-time PCR tekniği ve Maxima SYBR Green qPCR Master karışımı kullanılarak çoğaltıldı. Bu amplifikasyon sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı florimetrik deteksiyon filtresiyle ölçülmekte ve bu ölçümlerde floresan ışımaya, DNA ürünü ile orantılı olarak değişmektedir. LightCycler® 480 II cihazı, erime eğrisi analizi yapabilme özelliği ile primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünleri gibi hataları gözlemlemeye de olanak sağlamaktadır.

Real-time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla kontrol grubundan elde edilen cDNA örneğinden elde edilen ölçümlerle *β-aktin* arasındaki ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında analiz programı ile standart eğriler çizildi. Deneysel tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde deneysel hataları ve farkları azaltmak amacıyla beşer örnek olarak analiz edildi. Seçilen zaman noktalarında ekspres olan *β-aktin*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *kaspaz-3*, *p53* ve *tnf-α* gen miktarları ile dişi ve erkek, beyin ve karaciğer kontrol grubu arasındaki ilişki incelendi.

PCR karışımı, 1 µl forward primer (10 pmol), 1 µl revers primer (10 pmol), 10 µl SybrGreen karışımı (Maxima SYBR Green qPCR Master Karışımı ve ROX Solüsyonu, (Thermo Scientific K0252)), 1 µl cDNA ve 7 µl su eklenmiş, toplam hacim 20 µl'ye olacak şekilde ayarlandı. PCR'da her gene özgül döngü sayıları ve sıcaklık değerleri Tablo 2.3'de verildi.

Tablo 2.3. Çalışılan genlere ait PCR koşulları

Gen	Başlangıç Ayrılma			Ayrılma		Yapışma		Uzama		Döngü Sayısı
	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	
<i>β-Aktin</i>	95	10	1	95	30	55	30	72	30	35
<i>p53</i>	95	10	1	95	30	59	30	72	30	40
<i>Kaspaz-3</i>	95	10	1	95	30	58	30	72	30	40
<i>Bcl-2</i>	95	10	1	95	30	58	30	72	30	40
<i>Bcl-XL</i>	95	10	1	95	30	58	30	72	30	35
<i>Tnf-α</i>	95	10	1	95	30	65	30	72	30	35

2.2.5. Agaroz Jel Elektrofrezisi

Real Time PCR sonuçları agaroz jel elektrofrezisi ile görüntüldü. Agaroz jel miktarı 1g agaroz (Merck, 1.01236.0100) ve 50 ml 1×TAE (Tris asetat EDTA) Solüsyonu (Merck, 1.06023.1000) ile hazırlandı. Daha sonra karışım kaynatıldı ve agarozun çözünmesi sağlandı. Soğutulduktan sonra 2 μ l RedSafe renklendirme solüsyonu (İntron Biotechnology, 21141) eklendi ve karıştırılarak uygun sıcaklığa getirildikten sonra kalıba döküldü. 1 saat donması beklendikten sonra cDNA örnekleri yükleme boyası (6XTriTrack™ DNA Loading Dye, Thermo Scientific, #R1161) ile karıştırıldıktan sonra kuyucuklara eklendi. Baz uzunluğunun kontrolü için Gene Ruler 50bp Marker Plus (Thermo Scientific, #SM1108) belirteç kullanıldı ve Thermo Electron Corporatin 4000P Power Supply ile 7 V/cm 'da 1 saat koşturuldu. Örnekler Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi ile (Vilber Lourmat) görüntüldü.

2.2.6. Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Real-time PCR sonuçlarının analizi LightCycler® 480 Software Release 1.5.0 Version 1.5.0.39 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Denatürasyon, primer yapışması ve zincir uzatma olmak üzere üç basamaktan oluşan amplifikasyon işleminden sonra elde edilen amplifikasyon eğrilerine ait döngü eşiği (Ct) değerlerinden hareketle, hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı (Pfaffl 2001). Bu hesaplamada;

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{denek grubu}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{beta actin}})_{\text{kontrol grubu}}$$

formülünden yararlanıldı. Hesaplanan değer her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyi misli olarak azalma ya da artış şeklinde belirlendi. Endojen kontrol olarak β -*aktin* geni kullanıldı ve her bir örneğe ait β -*aktin* gen düzeyine göre diğer genlerin ekspresyon düzeylerinde düzeltme (normalizasyon) uygulandı.

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada, her bir gen bakımından farklı cinsiyet ve doku gruplarına göre deney grupları arasındaki farklılık ve ortalamalar tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) ve Tukey testi ile yapıldı.

Her bir gen bakımından tüm gruplar arasında fark olup olmadığı tek yönlü varyans analiziyle (One-Way ANOVA), gerek cinsiyet gerekse doku bakımından genlerin karşılaştırılması ise iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) testi ile yapıldı. Çalışmada elde edilen verilerin analizinde SPSS 15.0 for Windows paket programı kullanıldı.

3. BULGULAR

3.1. RNA İzolasyonu, Konsantrasyonu ve Kalitesi

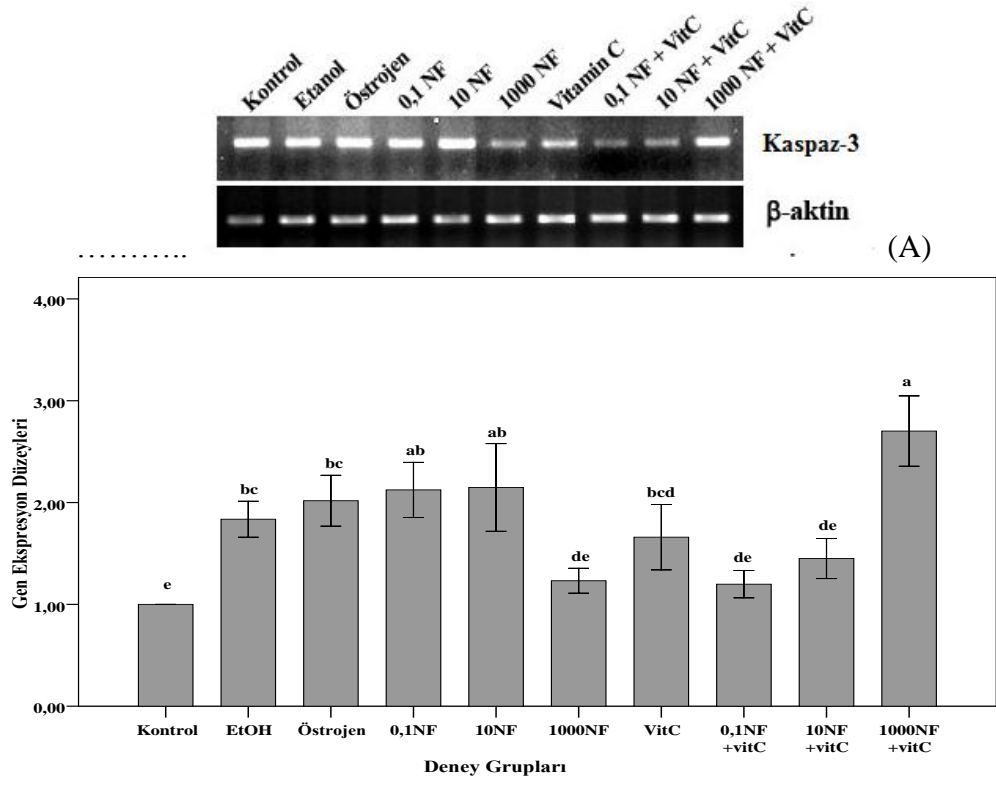
Ratların beyin ve karaciğer dokularından elde edilen RNA'ların saflığı Multiskan™ FC Mikroplate Fotometre (Thermo) cihazında A260/A280 UV dalga boylarında ölçülerek, emilim oranı 2-2,3 arasında olan örnekler tercih edilmiş, gruplara, cinsiyete ve dokulara göre izole edilen RNA miktarları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Cinsiyete ve dokulara göre izole edilen ortalama RNA miktarları (ng/μl).

Gruplar	Dişi		Erkek	
	Beyin	Karaciğer	Beyin	Karaciğer
Negatif Kontrol	190	476	154	540
Solvent (Etanol) Kontrol	188	1600	130	476
0,1 μg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	171	730	300	629
0,1 μg/ml NF	178	1130	130	747
10 μg/ml NF	160	277	102	542
1000 μg/ml NF	203	810	158	462
100 μg/ml C vitamini	135	980	139	428
0,1 μg/ml NF +100 μg/ml C vitamini	108	625	103	380
10 μg/ml NF +100 μg/ml C vitamini	132	838	112	353
1000 μg/ml NF +100 μg/ml C vitamini	163	935	117	381

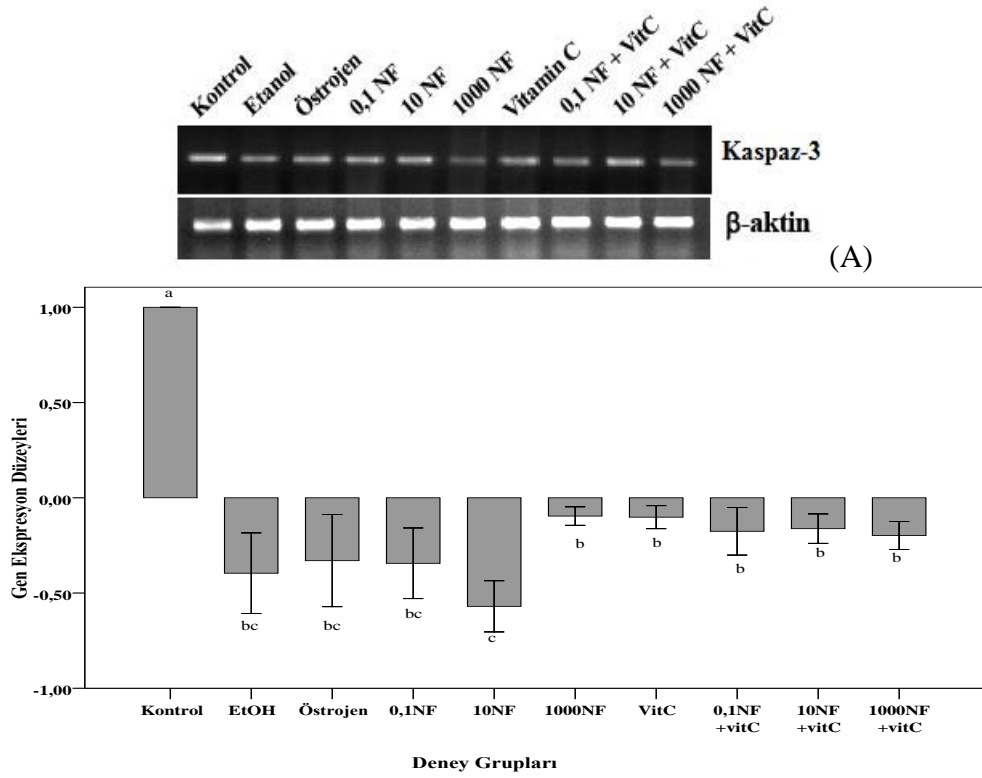
3.2. NF'nin *Kaspaz 3* Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

Kaspaz-3 gen ekspresyonunun kantitatif analizinde, ratların beyin ve karaciğer dokusundan elde edilen örneklerin amplifikasyonu analiz edildi. Agaroz jel elektroforezinde 286 baz çifti (bç) uzunluğunda beklenen ürün gözlemlendi. *Kaspaz-3*'ün gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4'de gösterildi.



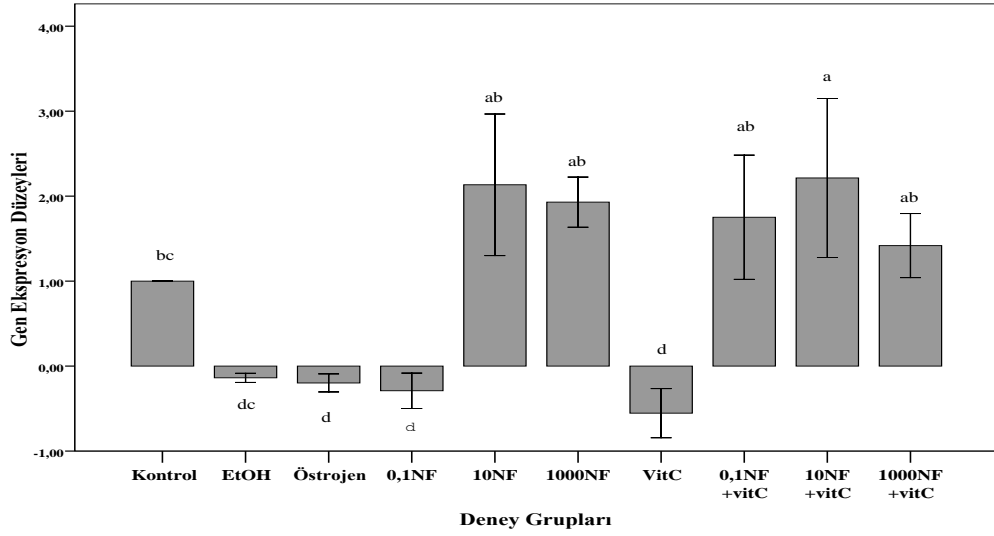
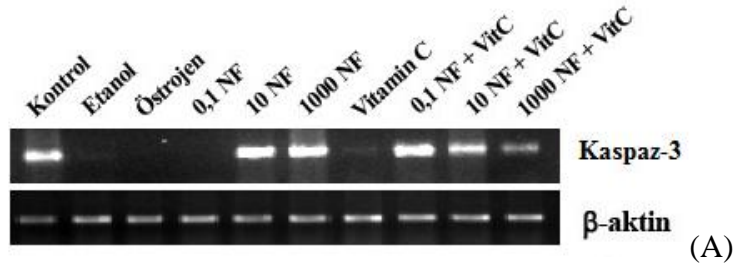
Şekil 3.1. Dişi ratların beyin dokusundaki *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: Deney gruplarında *kaspaz-3* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Tablo 2.1’de gösterilen deney gruplarındaki dişi ratların beyin dokusunda *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeylerinin β -aktin mRNA düzeyinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna göre gruplar arasında, istatistiksel olarak da farklı olan bir artış söz konusudur ($p < 0,001$). Özellikle 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda doz artışıyla doğru orantılı olarak gen ekspresyon düzeyinde kademeli olarak artış gözlenmiştir (Şekil 3.1).



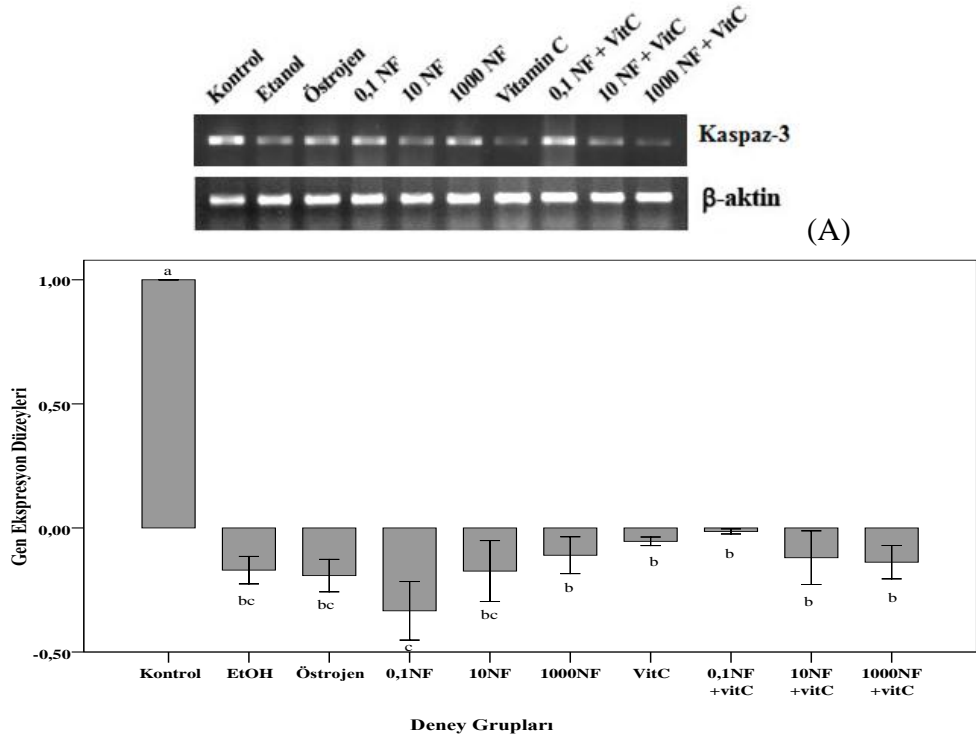
Şekil 3.2. Dişi ratların karaciğer dokusundaki *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin temsili elektroforez görüntüleri. B: Deney gruplarında *kaspaz-3* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Deney grupları (Tablo 2.1) arasındaki farklılık β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrole göre incelendiğinde tüm gruplardaki ekspresyon düzeylerinin belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 3.2). Ekspresyon 10 μ g/ml NF grubuna kıyasla 10 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini uygulanan grupta daha fazla baskılanmaktadır. Bu baskılanmanın istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 3.3. Erkek ratların beyin dokusundaki *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin temsili elektroforez görüntüleri. B: Deney gruplarında *kaspaz-3* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Tablo 2.1’de gösterilen gruplar arasındaki farklılık *β-aktin* mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrole göre kıyaslandığında (Şekil 3.3) *kaspaz-3* mRNA ekspresyon seviyesinin etanol, östrojen, 0,1 µg/ml NF ve C vitamini uygulanan gruplarda azaldığı, 0,1 µg/ml NF grubuna kıyas edildiğinde 0,1 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini uygulanan grupta ekspresyon seviyesinin uyarıldığı görülmektedir ($p < 0,001$).



(B)

Şekil 3.4. Erkek ratların karaciğer dokusundaki *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin temsili elektroforez görüntüleri. B: *kaspaz-3* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Genel olarak gruplar (Tablo 2.1) arasındaki farklılık kontrol grubuna göre incelendiğinde *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeylerinde azalma olduğu görülmektedir (Şekil 3.4). Gruplar arasındaki farklılıklara göre sadece 0,1 μ g/ml NF, 10 μ g/ml NF ve 1000 μ g/ml NF uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak ekspresyon seviyesinin arttığı ve C vitamini uygulamasıyla birlikte ekspresyonun azaldığı görülmektedir. Bu azalış ve artışın istatistiksel olarak farklı olduğu görülmektedir ($p<0,001$).

Tablo 3.2. Tüm deney gruplarındaki *kaspaz-3* mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Gruplar	n	Ortalama±Standart Hata
<i>Kaspaz-3</i>	Negatif Kontrol	20	1,00±0,00
	Solvent (Etanol) Kontrol	20	0,28±0,20
	0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	20	0,32±0,22
	0,1 µg/ml NF	20	0,28±0,24
	10 µg/ml NF	20	0,88±0,31
	1000 µg/ml NF	20	0,73±0,20
	100 µg/ml C vitamini	20	0,23±0,20
	0,1 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,60±0,16
	10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,88±0,26
	1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,96±0,28

Tablo 3.2’de gösterilen grupların aritmetik ortalama değerleri incelendiğinde kontrol grubuna göre tüm gruplarda ekspresyon düzeylerinde azalma görülmektedir. sadece NF uygulanan gruplarda, sadece NF ve C vitamini uygulanan gruplara göre gen ekspresyon düzeylerinin azaldığı görülse de söz konusu bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 3.3. *Kaspaz-3*’ün genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması

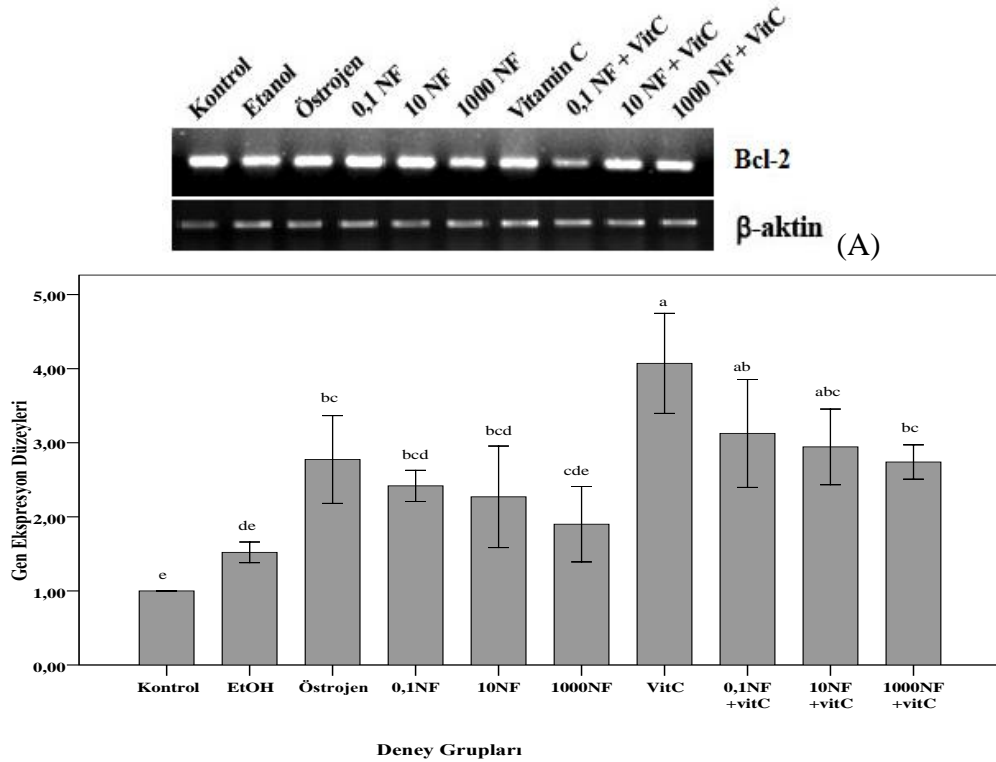
Gen	Cinsiyet	Doku	n	Ortalama±Standart hata
<i>Kaspaz-3</i>	Dişi*	Beyin	50	1,73±0,08
		Karaciğer	50	-0,013±0,06
	Erkek*	Beyin	50	0,91±0,16
		Karaciğer	50	-0,03±0,05
	Toplam	Beyin	100	1,32± 0,10
		Karaciğer	100	-0,08 ±0,04

*Cinsiyet*doku *toplam etkileşim arasındaki istatistiksel farkı açıklamaktadır ($p<0,05$).

Aritmetik ortalama değerleri incelendiğinde; *kaspaz-3* gen ekspresyonu üzerinde sadece cinsiyetler arasında, sadece dokular arasında ve hem cinsiyet hem de dokular arasında fark görülmektedir ($p<0,001$). Cinsiyet gözetmeksizin beyin dokusundaki ekspresyon düzeyinin karaciğer dokusundaki ekspresyon düzeyine göre artış gösterdiği, dokulara ve cinsiyete bağlı ekspresyon düzeylerinde farklılık olduğu Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

3.3. NF'nin *Bcl-2* Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

Bcl-2 gen ekspresyonunun kantitatif analizinde grupların beyin ve karaciğer dokusundan elde edilen verilerin amplifikasyonu yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde *bcl-2* gen uzunluğu doğrulandı. *Bcl-2*'nin gruplar arasındaki gen ekspresyon düzeyleri Şekil 3.5, 3.6, 3.7, 3.8'de gösterildi.

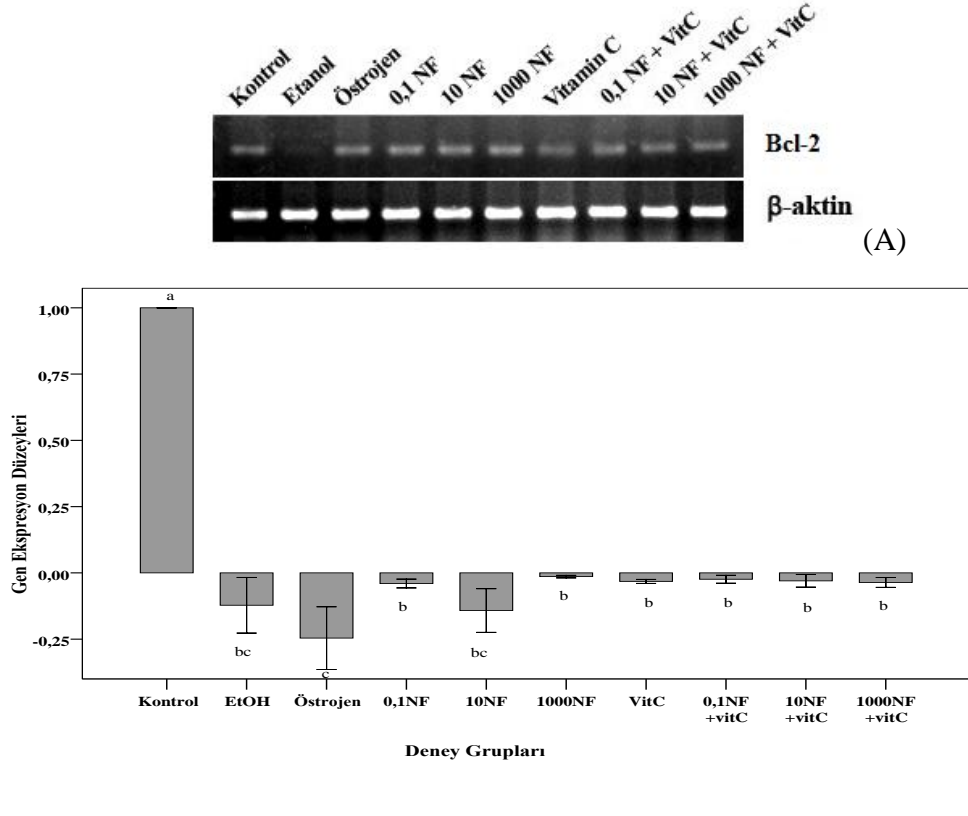


(B)

Şekil 3.5. Dişi ratların beyin dokusundaki *bcl-2* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-2* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

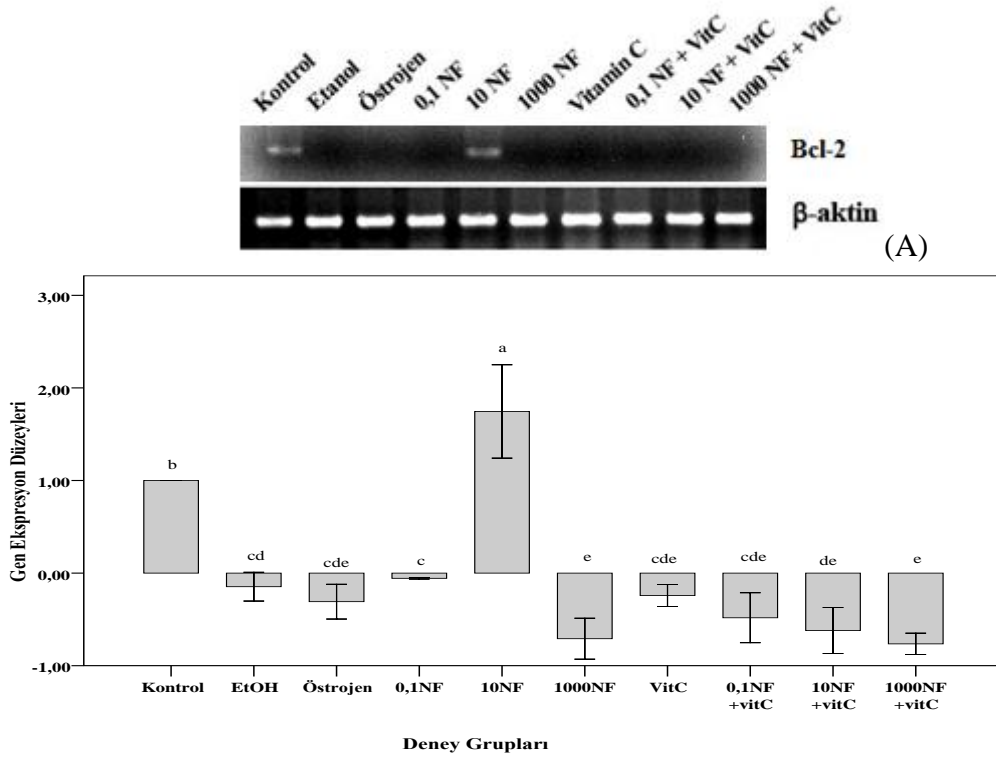
Bcl-2 gen ekspresyon düzeyi *β-aktin* mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda (Tablo 2.1) incelendiğinde ekspresyon seviyelerinin arttığı gözlenmiştir (Şekil 3.5). 0,1 µg/ml NF, 10µg/ml NF, 1000 µg/ml NF uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak ekspresyonun baskılandığı görülmüştür. Sadece NF uygulanan gruplar, NF ve C vitamini verilen gruplarla kıyaslandığında ise gen ekspresyon seviyelerinde artış görülse de doz

artışına bağlı olarak ekspresyon seviyesinde azalma meydana gelmiştir. Gruplar arasındaki bu değişim istatistiksel olarak da farklıdır ($p<0,001$).



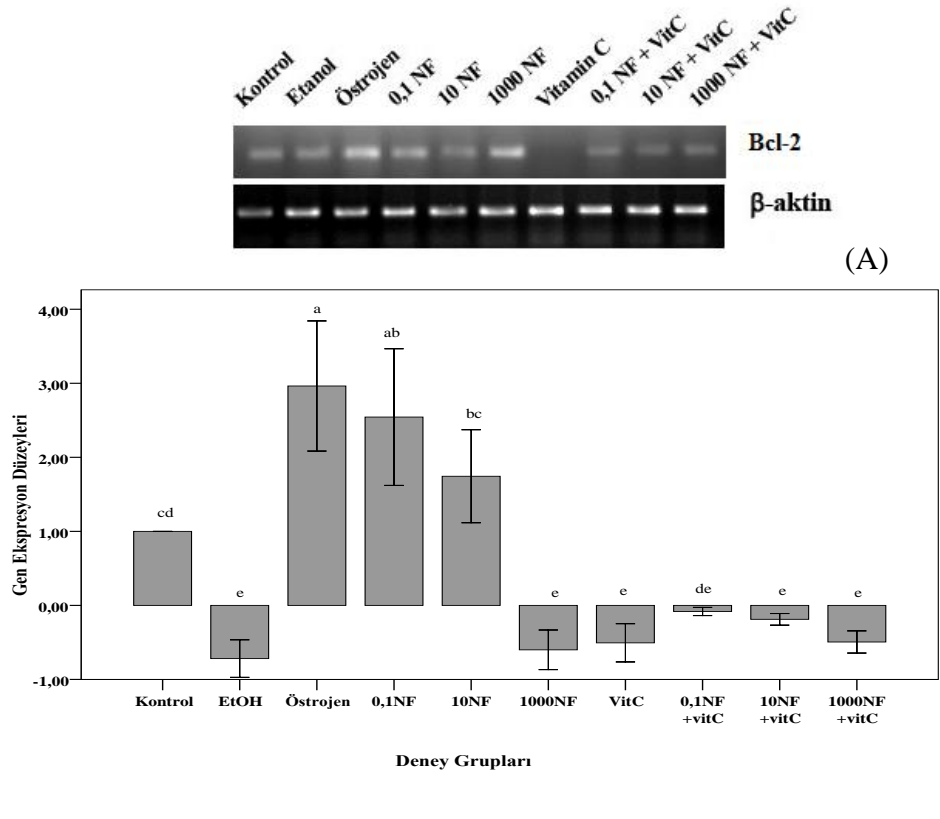
Şekil 3.6. Dişi ratların karaciğer dokusundaki *bcl-2* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-2* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Genel olarak Tablo 2.1’de gösterilen gruplar arasındaki farklılık kontrol grubuna ve β -aktin mRNA ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *bcl-2* gen ekspresyonunda tüm deney gruplarında baskılanma olduğu (Şekil 3.6), östrojen kontrol grubunda ise ekspresyonun en fazla baskılandığı görülmektedir ($p<0,001$).



(B)
Şekil 3.7. Erkek ratların beyin dokusundaki *bcl-2* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin temsili elektroforez görüntüleri. B: *bcl-2* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Gruplar (Tablo 2.1) arasındaki farklılık β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde (Şekil 3.7) sadece 10 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan grupta diğer gruplardan farklı olarak önemli uyarılma gözlenmiştir. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda da doz artışına paralel olarak artan bir baskılanma olduğu ve bunun da istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 3.8. Erkek ratların karaciğer dokusundaki *bcl-2* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin temsili elektroforez görüntüleri. B: *bcl-2* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.8’de görüldüğü üzere β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna göre *bcl-2* gen ekspresyon seviyelerinde 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF ve östrojen grubunda artış gözlenmiştir. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF gruplarında doz artışına paralel olarak bir azalma olduğu ve C vitaminine bağlı olarak azalmanın 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda devam ettiği görülmektedir. İstatistiksel olarak da farklı olan bu azalmanın artan NF konsantrasyonundan ve C vitamininden kaynaklandığı düşünülmektedir ($p < 0,001$).

Tablo 3.4. Tüm deney gruplarındaki *bcl-2* mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Gruplar	n	Ortalama±Standart Hata
<i>Bcl-2</i>	Negatif Kontrol	20	1,00±0,00
	Solvent (Etanol) Kontrol	20	0,13±0,19
	0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	20	1,29±0,38
	0,1 µg/ml NF	20	1,21±0,30
	10 µg/ml NF	20	1,40±0,24
	1000 µg/ml NF	20	0,14±0,25
	100 µg/ml C vitamini	20	0,82±0,44
	0,1 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,63±0,34
	10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,52±0,33
	1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,36±0,32

Tablo 3.4’de görüldüğü gibi gruplar arasında istatistiksel olarak fark vardır ($p<0,05$). 0,1 µg/ml östrojen, 0,1 µg/ml NF, 10 µg/ml NF uygulanan gruplarda ekspresyon seviyesi kontrol grubuna oranla artarken, 0,1 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini ve 10 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini uygulanan gruplarda doza bağlı olarak ekspresyon seviyesi azalmaktadır.

Tablo 3.5. *Bcl-2*’nin genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması

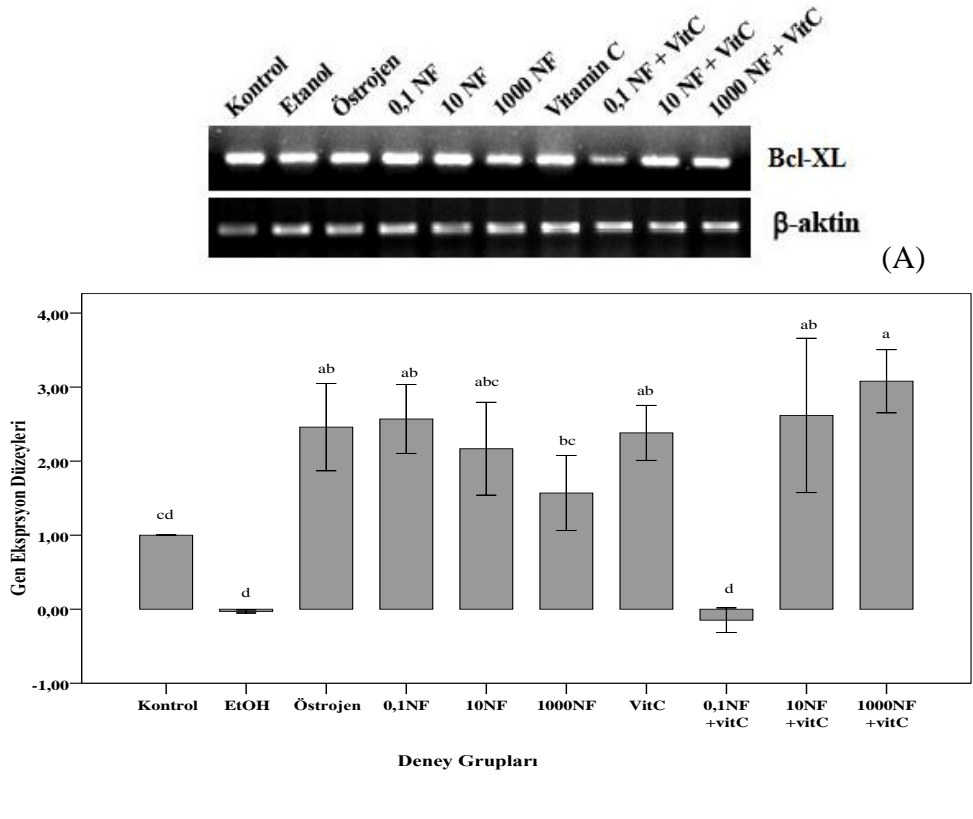
Gen	Cinsiyet	Doku	n	Ortalama±Standart hata
<i>Bcl-2</i>	Dişi*	Beyin	50	2,47±0,14
		Karaciğer	50	0,03±0,05
	Erkek*	Beyin	50	-0,05±0,11
		Karaciğer	50	0,56±0,20
	Toplam	Beyin	100	1,20±0,16
		Karaciğer	100	0,29±0,11

*Cinsiyet*doku *toplam etkileşim arasındaki istatistiksel anlamlılığı açıklamaktadır ($p<0,05$).

Tablo 3.5’de görüldüğü gibi *bcl-2* gen ekspresyon düzeyi, beyin dokusunda arttığı, karaciğer dokusunda azaldığı bulunmuştur. Ancak farkedilebilir bir şekilde dişi beyin dokusunda ekspresyon artarken, karaciğer dokusunda azaldığı; erkeklerde ise tam tersi durumun söz konusu olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

3.4. NF'nin *Bcl-XL* Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

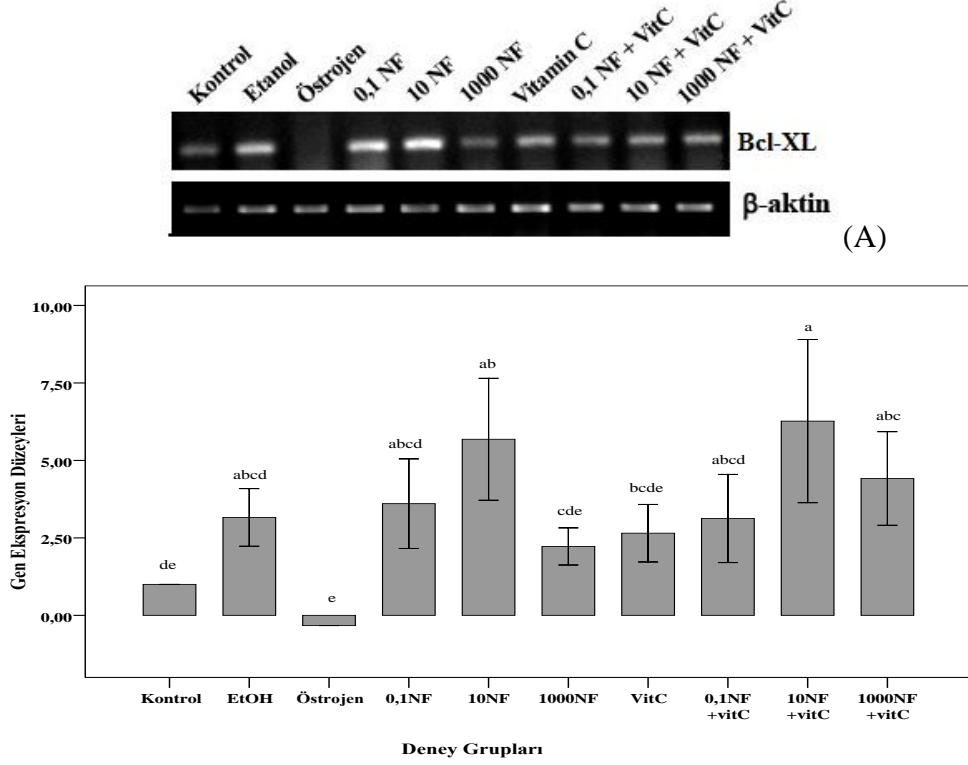
Bcl-XL gen ekspresyonunun kantitatif analizi grupların beyin ve karaciğer dokusundan elde edilen RNA ve RNA'dan izole edilen cDNA ile amplifikasyonu yapıldı. *Bcl-XL*'nin gruplar arasındaki gen ekspresyon seviyeleri Şekil 3.9, 3.10, 3.11 ve 3.12'de gösterildi.



Şekil 3.9. Dişi ratların beyin dokusundaki *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-XL* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

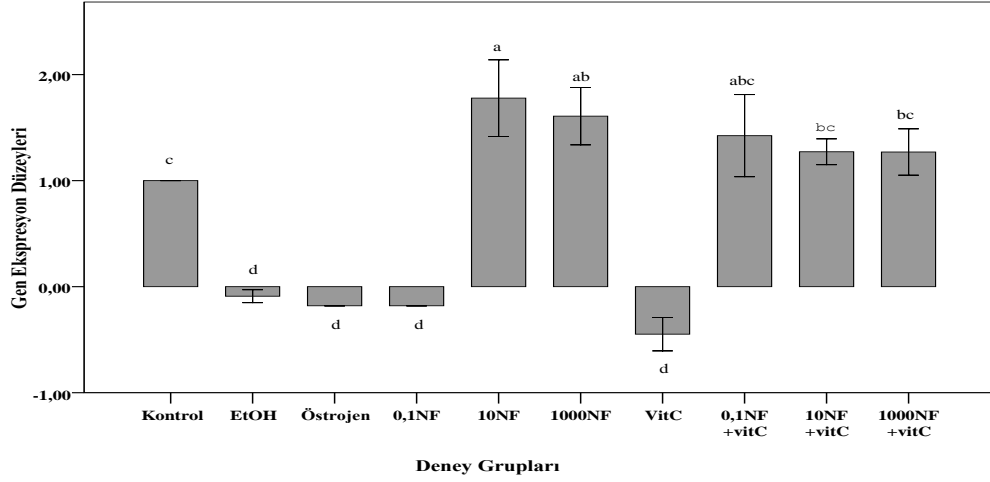
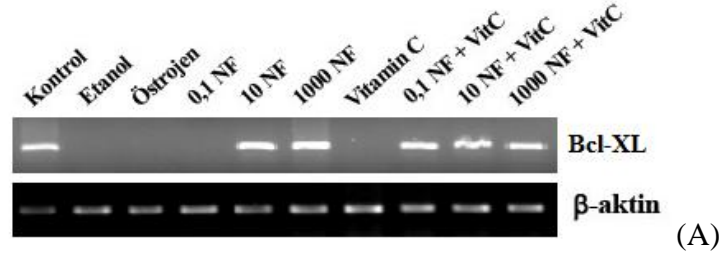
Tablo 2.1'de gösterilen gruplar arasındaki farklılık kontrol grubuna ve β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *bcl-XL* gen ekspresyon değişimi Şekil 3.6'da gösterilmiştir. 0,1 μ g/ml NF, 10 μ g/ml NF ve 1000 μ g/ml NF uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak ekspresyon seviyesinin azaldığı, 10 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini ve 1000 μ g/ml NF+100 μ g/ml C

vitamini uygulanan gruplarda da doza bağı olarak gen ekspresyon düzeyinin arttığı görülmüştür ($p<0,001$).



Şekil 3.10. Dişi ratların karaciğer dokusundaki *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-XL* mRNA düzeylerinin β -*aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

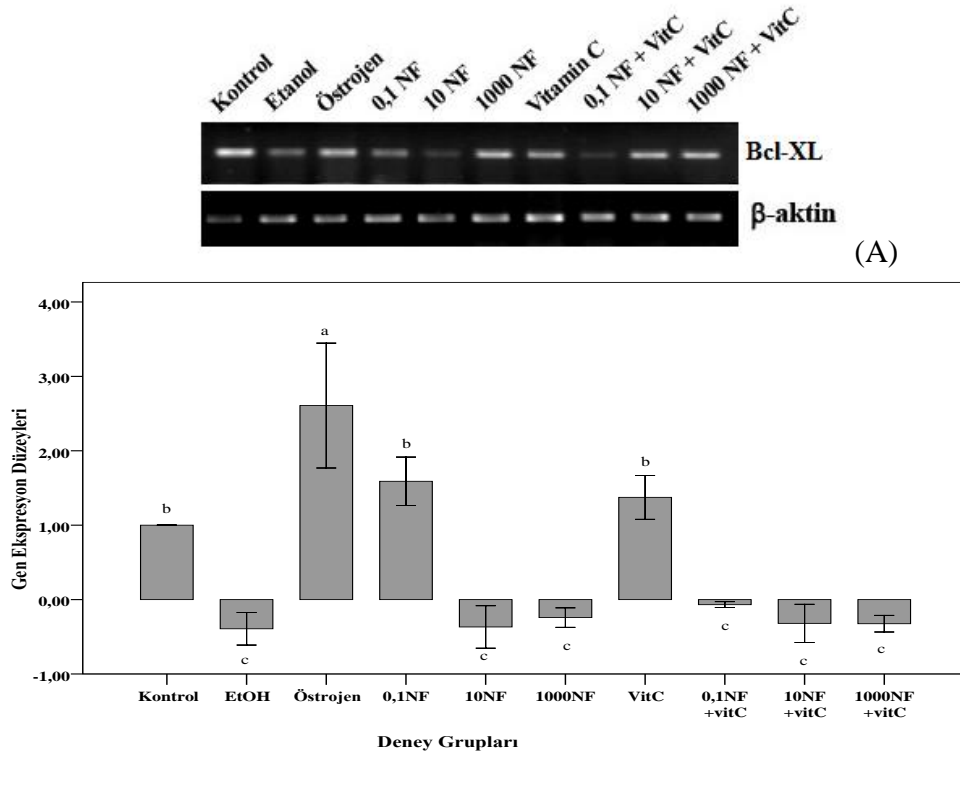
Şekil 3.10'da gösterildiği gibi gruplar (Tablo 2.1) arasındaki farklılık kontrol grubuna ve β -*aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *bcl-XL* gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak da farklı olan bir artış meydana gelmiştir ($p<0,001$). Buna göre 10 $\mu\text{g/ml}$ NF ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak gen ekspresyon düzeyinde meydana gelen artışın C vitamini uygulanan gruplarda da devam ettiği görülmüştür.



(B)

Şekil 3.11. Erkek ratların beyin dokusundaki *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: Deney grubundaki PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-XL* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.11’de görüldüğü üzere deney gruplarında (Tablo 2.1) *bcl-XL* gen ekspresyon miktarının azaldığı, sadece C vitamini uygulanan grupta ekspresyon azalmasına rağmen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. Aynı zaman da 10 $\mu\text{g/ml}$ NF ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre önemli bir artış söz konusudur. Gruplar arasında gözlenen artış ve azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p < 0,001$).



Şekil 3.12. Erkek ratların karaciğer dokusundaki *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *bcl-XL* mRNA düzeylerinin β -aktin mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.12’de görüldüğü gibi *bcl-XL* gen ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna ve β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde C vitamini uygulanan grupta ekspresyon düzeyinin arttığı halde 0,1 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini, 10 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini ve 1000 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak ekspresyon düzeyinin azaldığı görülmüştür. Sadece östrojen uygulanan grupta ise en fazla artışın olduğu bulunmuştur. Bu artış ve azalma istatistiksel olarak da farklıdır ($p < 0,001$).

Tablo 3.6. Tüm deney gruplarındaki *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Gruplar	N	Ortalama±Standart Hata
<i>Bcl-XL</i>	Negatif Kontrol	20	1,00±0,00 ^{ab}
	Solvent (Etanol) Kontrol	20	0,66±0,34 ^b
	0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	20	1,13±0,34 ^{ab}
	0,1 µg/ml NF	20	1,89±0,36 ^{ab}
	10 µg/ml NF	20	2,31±0,55 ^{ab}
	1000 µg/ml NF	20	1,29±0,23 ^{ab}
	100 µg/ml C vitamini	20	1,49±0,30 ^{ab}
	0,1 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	1,08±0,35 ^{ab}
	10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	2,45±0,64 ^a
	1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	2,11±0,45 ^{ab}

Tablo 3.6’da gösterilen *bcl-XL* mRNA ekspresyonu üzerindeki NF, etanol, östrojen ve C vitamin’in etkisi incelendiğinde genel olarak etanol grubu hariç tüm gruplarda ekspresyon düzeyinin arttığı görülmektedir. 10 µg/ml NF ve 1000 µg/ml NF uygulanan gruplardaki artan ekspresyon düzeyi, 10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini ve 1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini uygulanan gruplarda C vitaminin etkisiyle daha fazla artmaktadır. Cinsiyet ve doku gözetmeksizin gruplar arasındaki değişiklikler istatistiksel olarak da farklıdır ($p<0,05$).

Tablo 3.7. *Bcl-XL*’nin genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması

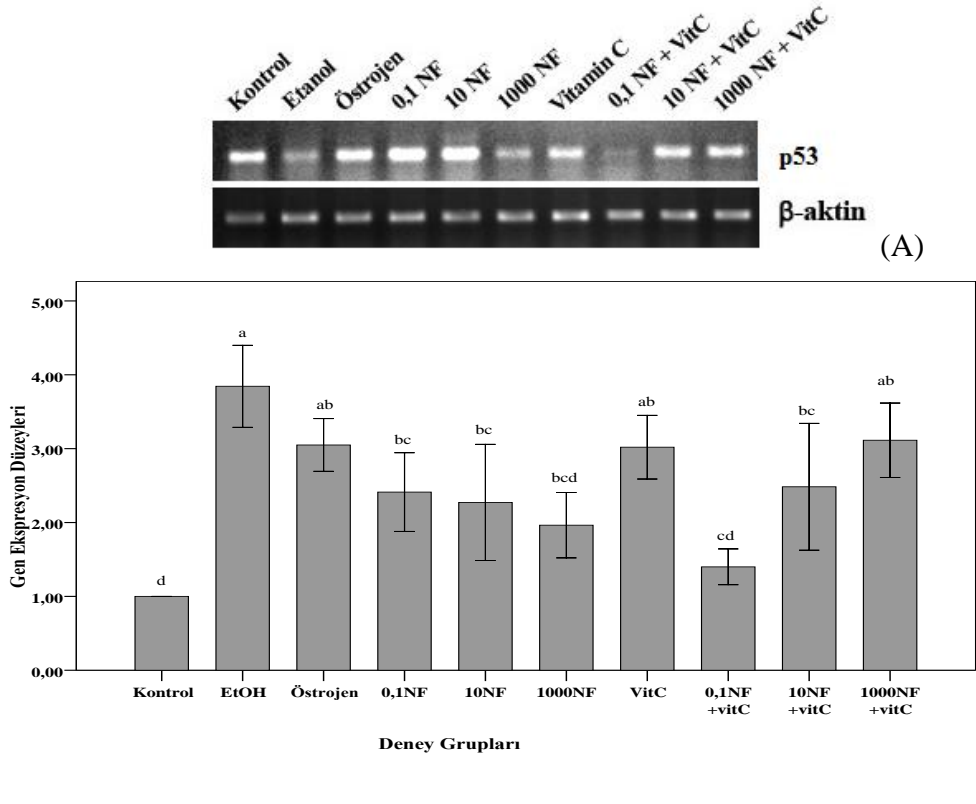
Gen	Cinsiyet	Doku	n	Ortalama±Standart hata
<i>Bcl-XL</i>	Dişi*	Beyin	50	1,76±0,17
		Karaciğer	50	3,18±0,34
	Erkek*	Beyin	50	0,71±0,12
		Karaciğer	50	0,48±0,15
	Toplam*	Beyin	100	1,25±0,12
		Karaciğer	100	1,83±0,23

*Cinsiyet*doku *toplam etkileşim arasındaki istatistiksel anlamlılığı açıklamaktadır ($p<0,05$).

Tablo 3.7’de görüldüğü gibi *bcl-XL* mRNA ekspresyon düzeyi β -aktin gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde; cinsiyet gözetmeksizin beyin ve karaciğer dokusunda ekspresyon düzeyinin arttığı, fakat karaciğerde daha fazla artış olduğu görülmüştür. En fazla ekspresyon artışının açık bir şekilde dişi karaciğer dokusunda olduğu, erkek karaciğer dokusunda ise azalmanın olduğu görülmüştür ($p<0,001$).

3.5. NF'nin *p53* Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

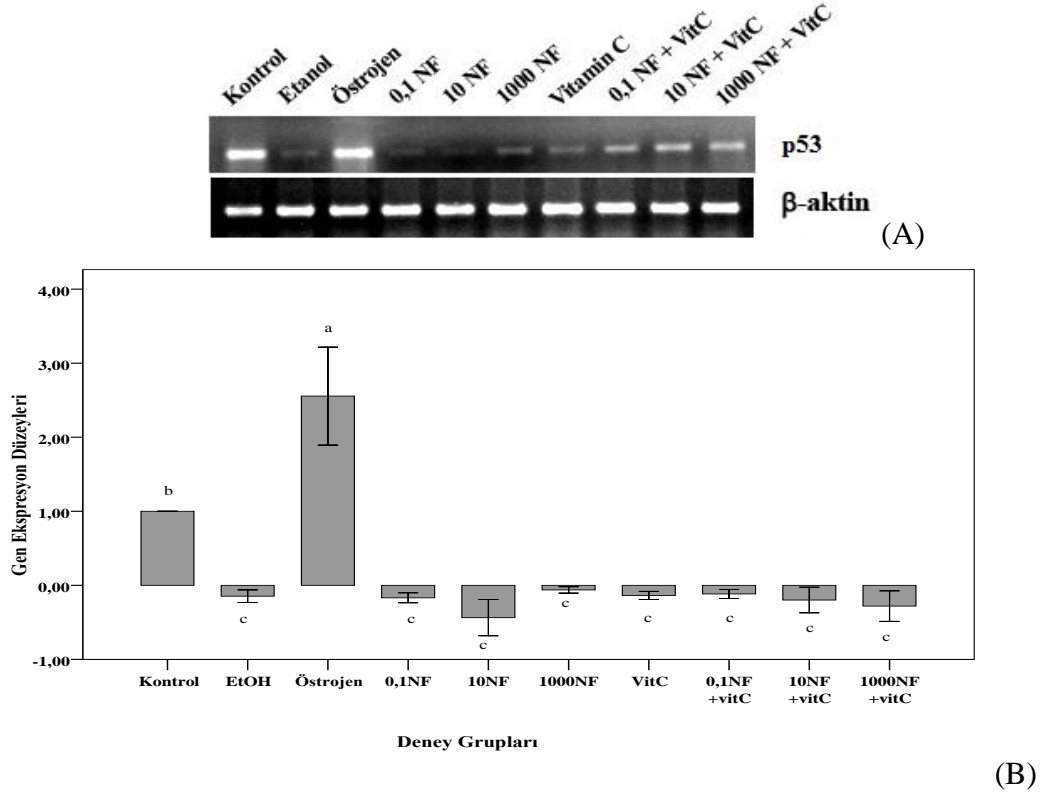
p53 gen ekspresyonunun kantitatif analizinde dişi ve erkek ratların beyin ve karaciğer dokusundan elde edilen RNA ve RNA'dan izole edilen cDNA ile hazırlanan örneklerin amplifikasyonu yapıldı. *p53*'ün gruplar arasındaki gen ekspresyon düzeyleri Şekil 3.13, 3.14, 3.15 ve 3.16'da gösterildi.



Şekil 3.13. Dişi ratların beyin dokusundaki *p53* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *p53* mRNA düzeylerinin *β -aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

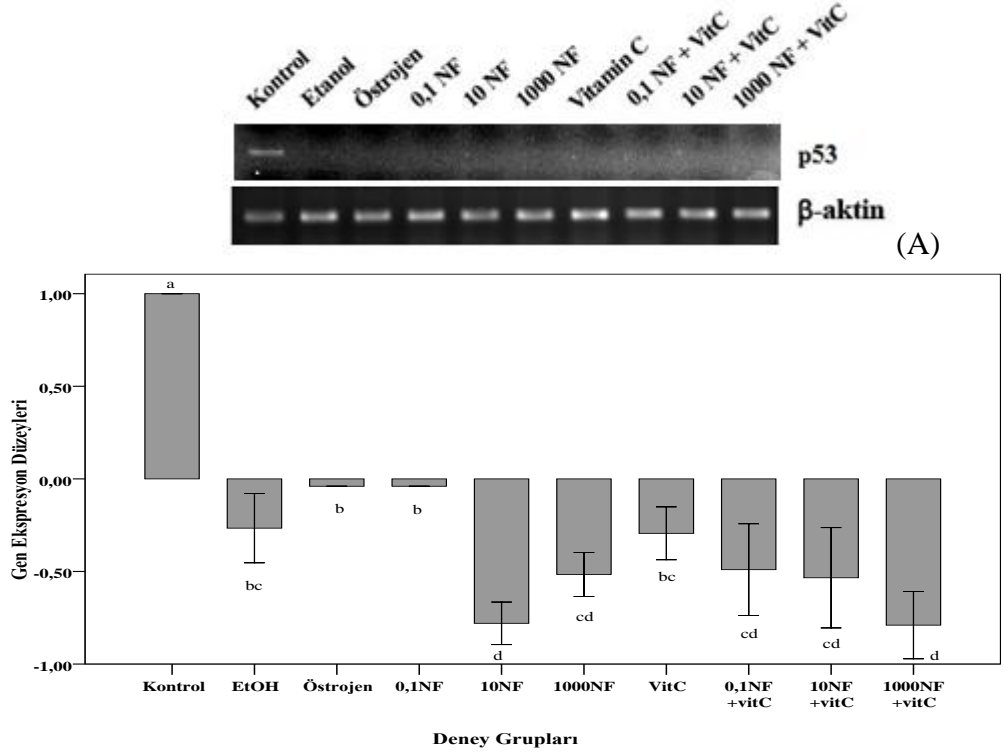
Tablo 2.1'de gösterilen gruplar arasındaki farklılık incelendiğinde *p53* gen ekspresyon düzeyinin tüm gruplardaki artışı Şekil 3.13'de gösterilmiştir. 0,1 μ g/ml NF, 10 μ g/ml NF ve 1000 μ g/ml NF uygulanan gruplarda doz artışına bağlı olarak gen ekspresyonunda azalma görülürken, 0,1 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini, 10 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini ve 1000 μ g/ml NF+100 μ g/ml C vitamini uygulanan gruplarda doz artışına bağlı olarak ekspresyon düzeylerinde bir artma

olduğu görülmüştür. *p53* mRNA ekspresyonu üzerinde gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık vardır ($p<0,001$).



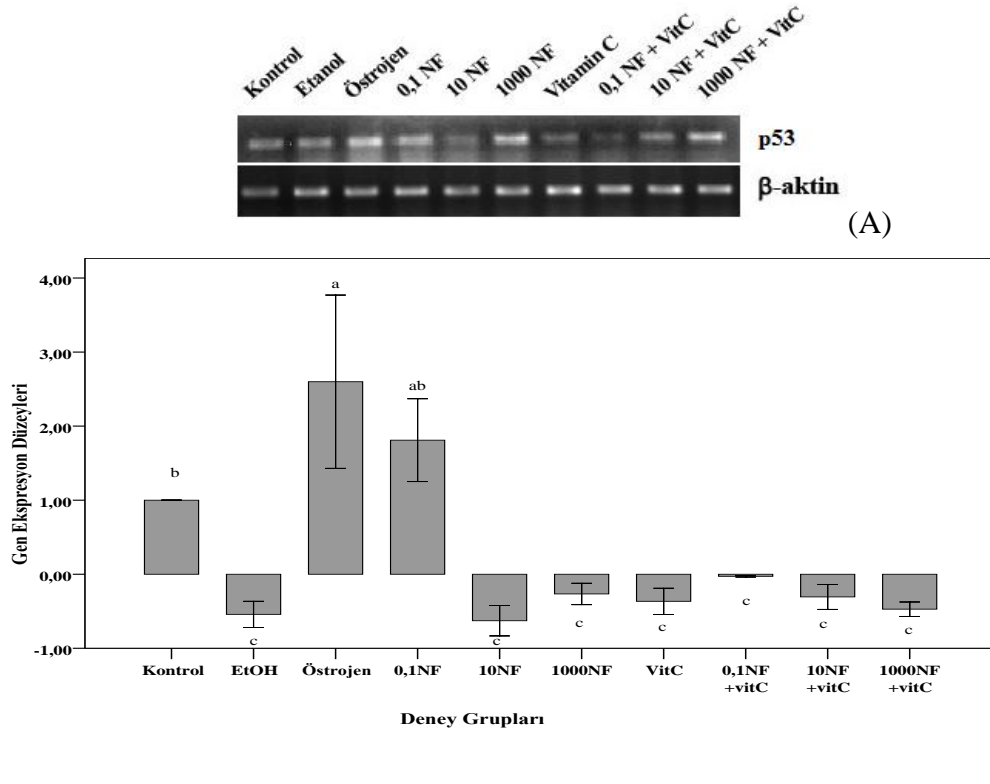
Şekil 3.14. Dişi ratların karaciğer dokusundaki *p53* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *p53* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Gruplar (Tablo 2.1) arasındaki farklılık kontrol grubuna ve *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *p53* gen ekspresyon düzeyinin tüm gruplarda azalmaya neden olduğu, ancak 0,1 $\mu\text{g/ml}$ östrojen uygulanan grupta ise artma olduğu Şekil 3.14’de gösterilmiştir. Bu durum istatistiksel olarak da farklıdır ($p<0,001$).



Şekil 3.15. Erkek ratların beyin dokusundaki *p53* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *p53* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneşsel gruptaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.15’de görüldüğü üzere *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna göre kıyaslanarak incelendiğinde *p53* gen ekspresyon düzeyi azalmaktadır. 10 µg/ml NF ve 1000 µg/ml NF uygulanan grupta doz artışına bağılı olarak gen ekspresyonunda artış olduğı, 0,1 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini, 10 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini ve 1000 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini uygulanan grupta doz artışına bağılı olarak ekspresyon düzeylerinde azalma olduğı bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 3.16. Erkek ratların karaciğer dokusundaki *p53* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *p53* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

p53 mRNA ekspresyonu üzerinde gruplar (Tablo 2.1) arasında istatistiksel olarak fark görülmüştür ($p < 0,001$). Östrojen ve 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF uygulanan gruplarda ekspresyon düzeyleri artarken diğer tüm gruplarda ekspresyon seviyesinde azalma olduğu C vitamini uygulanan gruplarda da azalmanın devam ettiği gözlenmiştir.

Tablo 3.8. Tüm deney gruplarındaki *p53*mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Gruplar	n	Ortalama±Standart Hata
<i>p53</i>	Negatif Kontrol	20	1,00±0,00 ^a
	Solvent (Etanol) Kontrol	20	0,72±0,42 ^{ab}
	0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	20	2,04±0,32 ^b
	0,1 µg/ml NF	20	1,00±0,27 ^b
	10 µg/ml NF	20	0,10±0,30 ^b
	1000 µg/ml NF	20	0,28±0,23 ^b
	100 µg/ml C vitamini	20	0,55±0,33 ^b
	0,1 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,19±0,16 ^b
	10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,36±0,30 ^b
	1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,66±0,98 ^b

Tablo 3.8’de gösterilen grupların aritmetik ortalama değerleri incelendiğinde ve *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine ve kontrol grubuna göre kıyaslandığında kontrol ve solvent (etanol) kontrol uygulanan grupların benzer olduğu ve diğer gruplarda önemli bir azalma olduğu, sadece östrojen verilen grupta ekspresyon düzeyinde artış olduğu görülmüştür. Söz konusu bu değişim istatistiksel olarak da farklıdır ($p<0,001$).

Tablo 3.9. *p53*’ün genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması

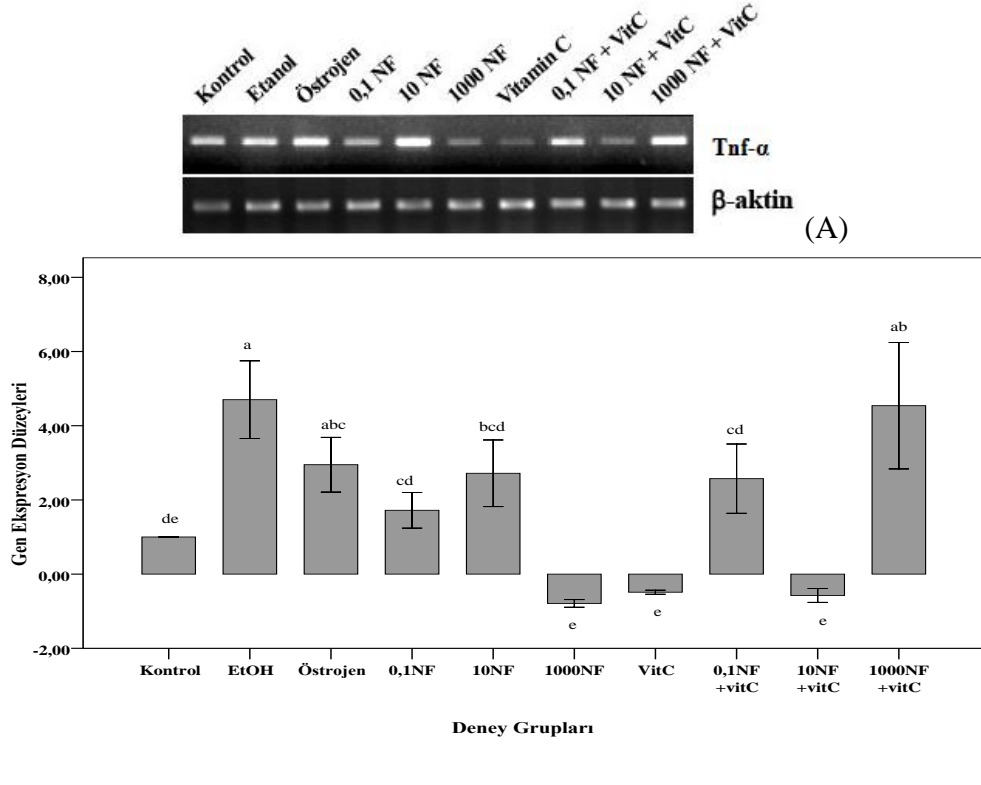
Gen	Cinsiyet	Doku	n	Ortalama±Standart hata
<i>p53</i>	Dişi*	Beyin	50	2,45±0,14
		Karaciğer	50	0,20±0,13
	Erkek*	Beyin	50	-0,27±0,07
		Karaciğer	50	0,28±0,17
	Toplam*	Beyin	100	1,09±0,16
		Karaciğer	100	0,24±0,10

*Cinsiyet*doku *toplam etkileşim arasındaki istatistiksel anlamlılığı açıklamaktadır ($p<0,05$).

p53 mRNA ekspresyonu üzerinde cinsiyet ve doku farklılıkları dikkate alındığında cinsiyet gözetmeksizin beyin dokusunda ekspresyon düzeyi artarken, karaciğer dokusunda azalmaktadır. Cinsiyete bağlı olarak da dişi beyin dokusunda ekspresyon düzeyi artarken, erkek beyin dokusunda ekspresyon düzeyinin azaldığı, karaciğer dokusunda ise önemli bir değişim olmadığı görülmüştür (Tablo 3. 9). Bu değişim istatistiksel olarak da farklıdır ($p<0,001$).

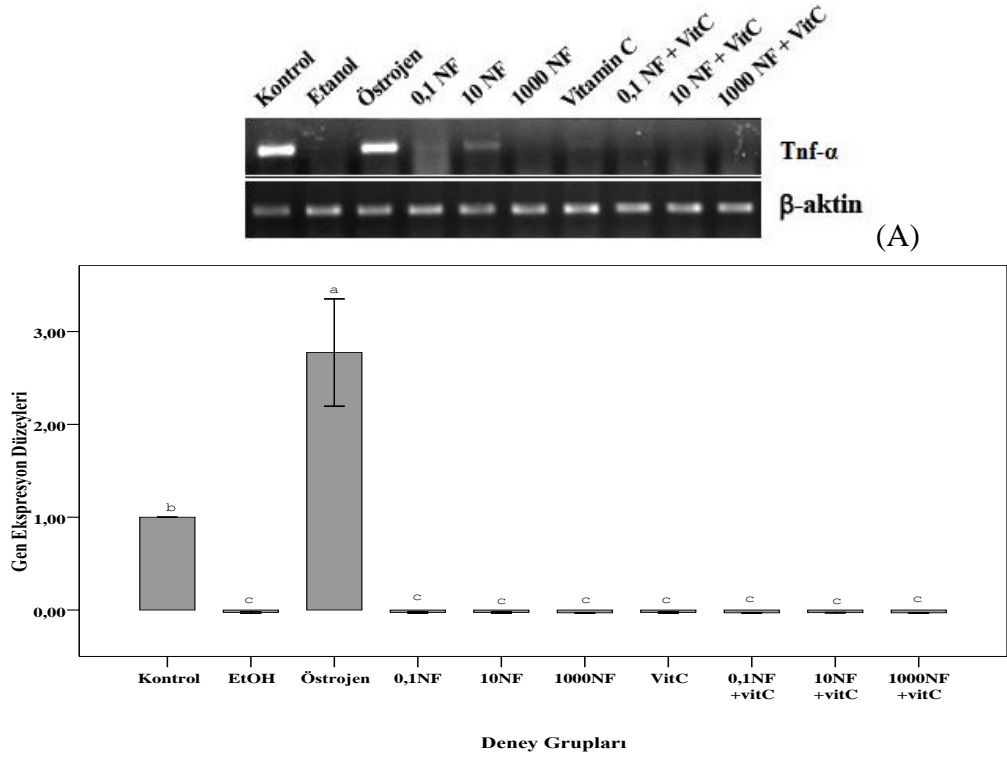
3.6. NF'nin *Tnf-α* Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

Tnf-α gen ekspresyon analizinde dişi ve erkek ratların beyin ve karaciğer dokusundan hazırlanan örneklerin amplifikasyonu yapıldı. *Tnf-α*'nın gruplar arasındaki gen ekspresyon düzeyleri de Şekil 3.17, 3.18, 3.19 ve 3.20'de gösterildi.



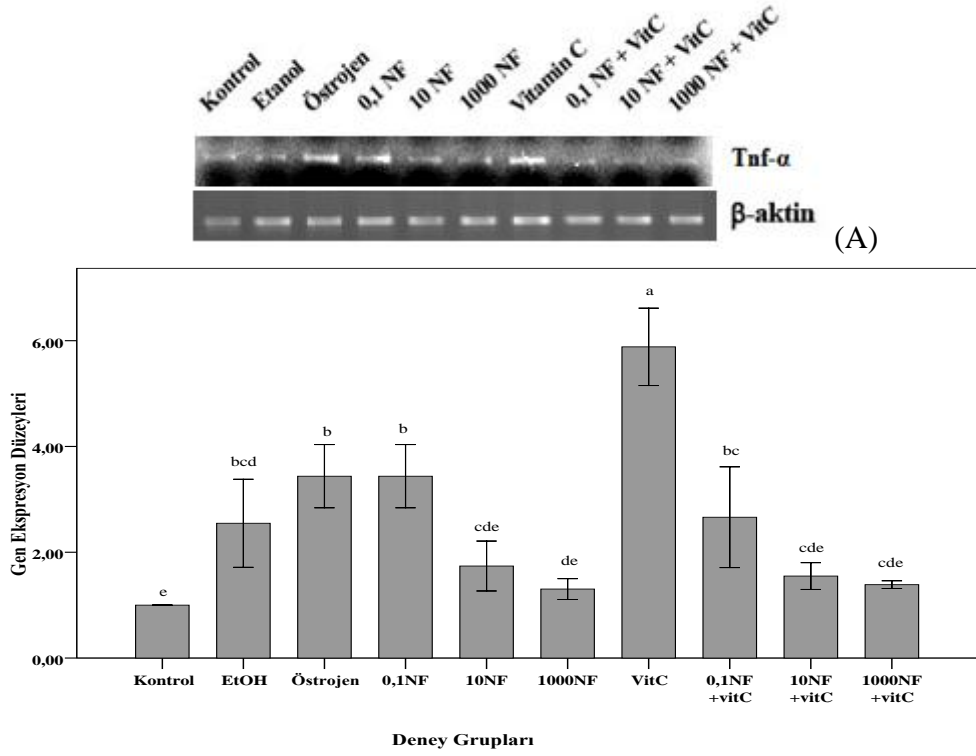
Şekil 3.17. Dişi ratların beyin dokusundaki *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *tnf-α* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p<0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Gruplar (Tablo 2.1) arasındaki farklılık kontrol grubuna ve *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *tnf-α* gen ekspresyon düzeyinde istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p<0,001$). Gruplar arasındaki ekspresyon düzeyleri etanol, östrojen, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF +100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda artarken, 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF, C vitamini ve 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 3.17).



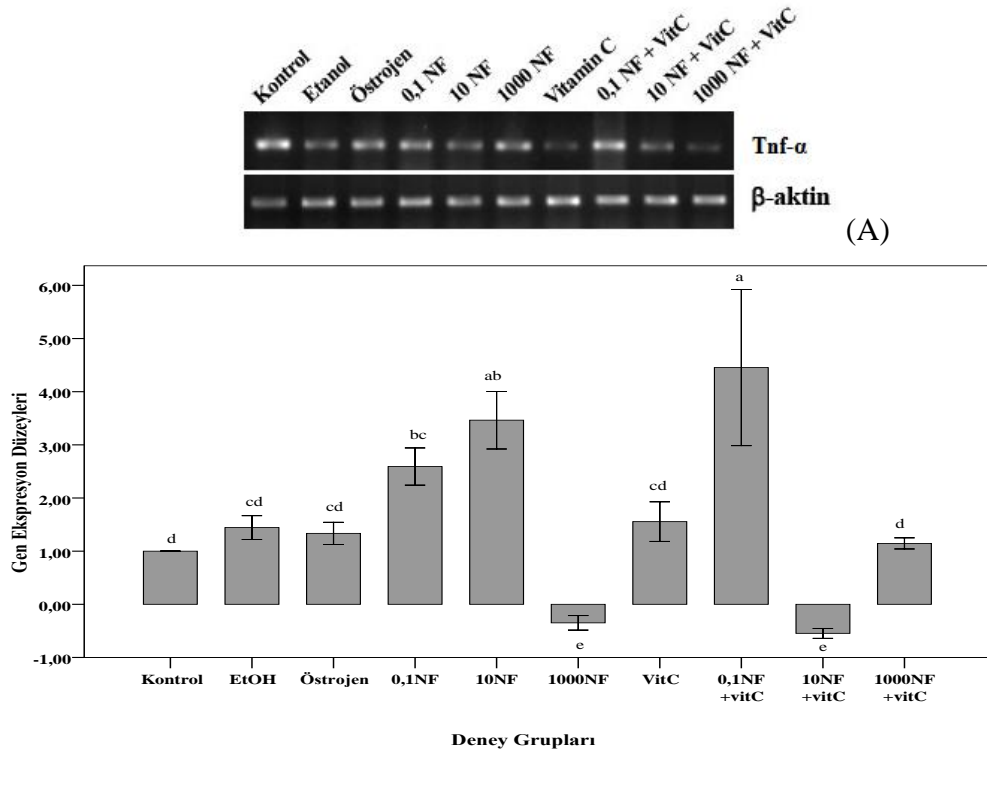
Şekil 3.18. Dişi ratların karaciğer dokusundaki *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: *tnf-α* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.18’de görüldüğü gibi gruplar (Tablo 2.1) arasındaki değişiklikler kontrol grubuna ve *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde *tnf-α* gen ekspresyon düzeylerinde genel olarak bir azalma görülürken, 0,1 µg/ml östrojen uygulanan grupta önemli bir artma meydana gelmiştir. Görülen bu artma ve azalma istatistiksel olarak da farklıdır ($p < 0,001$).



(B)
Şekil 3.19. Erkek ratların beyin dokusundaki *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: Deney gruplarında *tnf-α* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Tablo 2.1’de gösterilen gruplar arasındaki değişiklikler incelendiğinde *tnf-α* gen ekspresyon düzeylerinde genel olarak bir artış görülmektedir (Şekil 3.19) 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF, 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini, 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini ve 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda doz artışına paralel olarak ekspresyon düzeylerinde azalma görülürken, C vitamini uygulanan grupta *tnf-α*’nın en fazla eksprese olduğu ve tüm bu durumların istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur ($p < 0,001$).



Şekil 3.20. Erkek ratların karaciğer dokusundaki *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyleri. A: PCR ürünlerinin elektroforez görüntüleri. B: Deney gruplarında *tnf-α* mRNA düzeylerinin *β-aktin* mRNA düzeylerine göre nisbi değişimi. Farklı harfler $p < 0,001$ seviyesinde deneysel gruplardaki etkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir ($n=5$).

Şekil 3.20'de gösterilen gen ekspresyon düzeyinin değişimi incelendiğinde istatistiksel olarak fark görülmüştür ($p < 0,001$). Sadece 1000 $\mu\text{g/ml}$ NF ve 10 $\mu\text{g/ml}$ NF+100 $\mu\text{g/ml}$ C vitamini uygulanan gruplarda *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyi azalırken diğer gruplarda artış gözlenmiştir.

Tablo 3.10. Tüm deney gruplarındaki *tnf-α* mRNA ekspresyon düzeyleri

Gen	Gruplar	n	Ortalama±Standart Hata
<i>Tnf-α</i>	Negatif Kontrol	20	1,00±0,00 ^{bc}
	Solvent (Etanol) Kontrol	20	2,16±0,42 ^{ac}
	0,1 µg/ml Östrojen (17β-Östrodiol)	20	2,62±0,22 ^a
	0,1 µg/ml NF	20	1,93±0,30 ^{ab}
	10 µg/ml NF	20	1,97±0,32 ^{ab}
	1000 µg/ml NF	20	0,03±0,18 ^c
	100 µg/ml C vitamini	20	1,73±0,58 ^{ab}
	0,1 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	2,41±0,43 ^{ab}
	10 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	0,10±0,20 ^c
	1000 µg/ml NF +100 µg/ml C vitamini	20	1,76±0,43 ^{ab}

Tablo 3.10’da gösterilen tüm grupların aritmetik ortalama değerleri beyin ve karaciğer dokularından alınan örneklerin kontrol örneklerine oranlaması sonucu *tnf-α* gen ekspresyonu üzerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p<0,001$). Buna göre doza bağlı olarak açık bir artma ve azalma görülmemiştir. Ancak 10 µg/ml NF uygulanan gruba göre 10 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini uygulanan grup kıyaslandığında farkedilebilir bir azalma, 1000 µg/ml NF ile 1000 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini ve 0,1 µg/ml NF ile 0,1 µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini uygulanan grup kıyaslandığında farkedilebilir bir artış gözlenmiştir.

Tablo 3.11. *Tnf-α*’nın genel olarak cinsiyet ve dokulara göre karşılaştırılması

Gen	Cinsiyet	Doku	N	Ortalama±Standart hata
<i>Tnf-α</i>	Dişi*	Beyin	50	1,83±0,30
		Karaciğer	50	0,35±0,13
	Erkek*	Beyin	50	2,49±0,22
		Karaciğer	50	1,60±0,22
	Toplam	Beyin	100	2,16±0,19
		Karaciğer	100	0,98±0,14

*Cinsiyet*doku etkileşimi arasındaki istatistiksel anlamlılığı açıklamaktadır ($p>0,05$).

Aritmetik ortalama değerleri incelendiğinde *tnf-α* mRNA ekspresyonu üzerinde cinsiyet ve doku etkileşimleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken ($p>0,05$), sadece dokular arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Cinsiyet gözetmeksizin kontrol grubuna göre beyin dokusunda ekspresyon düzeyinde artış, karaciğer dokusunda ekspresyon düzeyinde de azalma meydana gelmiştir (Tablo 3.11).

4. TARTIŞMA

NF'nin nörotoksikan rol üstlendiği, beyinde apoptotik genlerin ekspresyonunu artırabildiği, apoptozis, nörotoksisite ve bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişki halinde olabildiği rapor edilmektedir. Kronik NF uygulamasının belirlenmesinin, *in vivo* apoptozis kaynağını bulmak için en önemli araştırma konularından biri olabileceği bildirilmiştir (Mao ve ark., 2008).

Gong ve ark., (2009) NF uygulanan fare sertoli hücrelerinde canlılığın azaldığını, morfolojik değişikliklerin olduğunu ve hücre apoptozis oranında artış meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Ek olarak hücre içi Ca^{+2} seviyelerindeki artışla birlikte, endoplazmik retikulumun (ER) nanoölçümsel yapısında değişikliğe neden olduğu ve NF'nin apoptozis uyarılmasında önemli rol oynayabilen sertoli hücrelerinde ER stresini uyardığı bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında; çevrede bulunan, öldürücü olan ve olmayan konsantrasyonlardaki NF'nin farklı dozları seçilerek deney düzeni oluşturulmuştur (Denslow ve ark., 2001; Olsvik ve ark., 2009; Midhila ve Chitra, 2015). Denslow ve ark., (2001), yüksek doz 17β -östrodiol ve NF'nin sucül çevredeki konsantrasyonlarına maruz bırakılan ufak balıklardaki östrojen reseptör mRNA ekspresyon düzeylerinden elde edilen verilerinin hemen hemen aynı bulunduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda, Shanthanagouda ve ark., (2013)'da, hem NF'nin hem de 17β -östrodiol'un yetişkin Murray nehir gökkuşağı balıkları üzerinde yıkıcı bir etkiye sahip olduğunu ve cinsiyet farklılaşması, seksüel davranışlar ve üreme siklusu üzerinde kötü etkilere neden olabileceğini rapor etmektedirler. Yapılan çalışmalar dikkate alındığında bu tez çalışmasında, östrojenin etkisininin daha açık bir şekilde anlaşılabilmesi ve NF'nin östrojeni taklit etme yeteneğine sahip olmasından dolayı deney düzeninde kontrol olarak östrojen grubuna da yer verilmiştir.

Nagao ve ark., (2001)'nin yaptığı çalışmada, NF'nin ratlar üzerinde üremeye olan etkisi incelenmiş ve erkeklerin karaciğer, böbrek ve hipofiz bezi ağırlıklarının

önemli derecede arttığını, dişilerde ise sadece ovaryum ağırlığında azalmaya neden olduğunu, Jung ve ark., (2006)'da NF'ye dişilerin erkeklerden daha hassas olduğunu rapor etmektedirler. Bu durum NF'ye maruz kalan erkek ve dişilerin farklı sonuçlar doğurabileceğini desteklemektedir. Bu tez çalışmasında da, NF'nin bilinen östrojenik etkisinden dolayı, çalışmada kullanılan ratlar hem erkek hem de dişi olarak seçilmiştir.

Lopez-Espinosa ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmada, Güney İspanya'da alkilfenollere maruz kalan kadınların yağ dokularında NF varlığı tespit edilmiş, Diamanti-Kandarakis ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmada ise, NF ve BFA'nın yağ dokusunda biriktiği bildirilmiştir. Zamana ve konsantrasyona bağlı olarak NF'nin olgun yağ gözesinde farklılaşarak hızla yayıldığı da rapor edilmektedir. Uğuz ve ark., (2003a, b)'nin yaptığı çalışmalara göre AFE'ler hidrofobik (suda çözünmeyen) ve lipofilik (yağda çözünen) özelliklerinden dolayı, sularda değil, sediman ve suda yaşayan canlılarda biriktiği rapor edilmiştir. Çalışmada NF'nin yağda çözünebilme özelliğinden dolayı yağ oranı yüksek olan beyin dokusu ve hayati öneme sahip karaciğer dokusu seçilerek NF'nin genler üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu tez çalışmasında seçilmiş apoptotik ve anti-apoptotik genlerdeki (*kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *p53*, *tnf-α*) gen ekspresyon düzeylerinin değişimi üzerindeki NF'nin etkisi araştırılmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri, real-time PCR cihazından elde edilen veriler kullanılarak, *β-aktin* mRNA düzeyinin nisbi değişimi ve kontrol grubuna göre hesaplanan değer, her bir gen için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak mRNA ekspresyon düzeyinin misli olarak azalması ya da artışı şeklinde belirlenmiştir. Elde edilen veriler gen ekspresyon düzeyi hakkında en doğru sonucu sayısal değerlerle vermektedir.

Bu tez çalışmasında, apoptozis boyunca aktif olan ve apoptozisin ana yürütücüsü olan, *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna ve *β-aktin* gen ekspresyon düzeylerinin nisbi değişimine göre incelendiğinde Tablo 3.3'de gösterildiği gibi cinsiyet gözetmeksizin beyin dokusunda daha fazla hasar oluşturduğu bulunmuştur. Ayrıca tüm veriler dikkate alındığında (Tablo 3.2) artan

NF konsantrasyonuna bağlı olarak *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyinin uyarıldığı hatta C vitaminin etkisiyle *kaspaz-3*'ün daha fazla eksprese olduğu ortaya çıkarılmıştır.

TUNEL ve DNA fragment analizi kullanılarak tümör hücre hattında, apoptozis üzerinde NF'nin etkisi incelendiğinde; *bcl-2* aktivitesinde önemli bir değişiklik gözlenmezken, NF miktarının artması ile *kaspaz-3* aktivitesinin arttığı ve 100 ng/ml dozun altındaki NF'nin, tümör hücre hattında *kaspaz-3* aktivitesiyle uyarılmış apoptozisi arttırdığı (Aoki ve ark., 2004), aynı zamanda NF'nin *kaspaz-3* aktivasyonunu mitokondriyal depolarizasyonu ile apoptozisi uyardığı bildirilmiştir (Yao ve ark., 2006). Yapılan bu çalışmalar da bu tez çalışmasındaki NF'nin *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyini arttırdığını desteklemektedir.

BFA, NF ve OF'nin beyin (Aydoğan ve ark., 2008) ve karaciğer dokusunda (Korkmaz ve ark., 2010) oksidatif hasara neden olduğu, C vitamini ile birlikte uygulandığında da beyin dokusunda oksidatif hasarı şiddetlendirdiği bildirilmiştir. Bu da göstermektedir ki; bu tez çalışmasında apoptozisi uyaran *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyinin artması, NF'nin hücreleri apoptozise götürdüğünü ve C vitaminin de bu durumu ağırlaştırdığı sonucunu desteklemektedir.

Apoptozu engelleyen anti-apoptotik bir protein olan *bcl-2* gen ekspresyon düzeyinde Tablo 2.1'de gösterilen deney grupları arasındaki farklılıklar incelendiğinde, sadece NF'nin tüm gruplarda görülen ekspresyon düzeyini azaltması hücrelerin fonksiyonlarını yitirdiğini ve apoptozisin başladığını, C vitaminin de bu durumu arttırdığı (Tablo 3.4), cinsiyete göre değerlendirildiğinde ise Tablo 3.5'de görüldüğü gibi NF'nin dişi beyinde daha fazla hasara yol açtığı bulunmuştur.

Son yıllarda bir tümör baskılayıcı gen olan *p53* ve apoptozisi kontrol eden *bcl-2* geninin, birçok tümörün gelişiminde ve seyrinde rol oynadığı rapor edilmektedir (Süllü ve ark., 2006). Bu nedenle çalışmamızda hem *p53* geni hem de *bcl-2* geni ile çalışma yapılmıştır.

Mao ve ark., (2008) NF'nin beyindeki apoptozisle ilişkisini belirlerken, bu tez çalışmasında da olduğu gibi, NF'nin fare beyinde *bcl-2* mRNA ekspresyonunu azalttığını, apoptozisi uyaran, aktif *kaspaz-3*'ün ekspresyonunu arttığını bildirmişlerdir.

Jubendradass ve ark., (2012) yaptığı çalışmayla bu çalışmada kullanılan NF miktarlarının benzer olması ile apoptozisle ilişkili olan genlerin çalışması benzemektedir. NF'nin ratların karaciğerinde apoptozisi indükleyen, sitokrom c, *kaspaz-3*, *kaspaz-8*, *kaspaz-9*, *Fas* ve *Fas-L* mRNA seviyelerini artırdığı, *bcl-2* mRNA (anti-apoptotik) seviyelerini azalttığı, *bax* mRNA (apoptotik) ekspresyonu, *kaspaz-3* yerleşimini arttığı, karaciğerde DNA hasarı oluşturduğu, apoptozisi uyardığı ve karaciğerde tahribata yol açabildiği bildirilmiştir. Bu durum bu tez çalışmasında da bulunan sonuçlarla örtüşmektedir. NF'nin sadece beyin dokusunda değil karaciğer dokusunda da hasara yol açabileceğini de desteklemektedir.

NF'nin artan dozuna bağlı olarak tüm deney gruplarında (Tablo 2.1) *bcl-2* mRNA ekspresyon seviyelerinin azalması ve C vitamini etkisiyle azalmasının devam etmesi, yani hücredeki DNA hasarına bağlı olarak apoptozisin uyarıldığını ve C vitaminin ağırlaştırıcı etkisinin olduğunu da desteklemektedir.

Hücresel sistemde apoptozisin düzenlenmesini inhibe eden ve mitokondride apoptotik değişikliklere karşı koruyucu olan *bcl-2* aile üyelerinden biri olan *bcl-XL* tümör gelişimi ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Çalışmamızda Tablo 2.1'de gösterilen genel gruplar arasındaki farklılıklar incelendiğinde *bcl-XL* gen ekspresyonunun dişi gruplarda arttığı, erkek gruplarda ise azaldığı NF'ye erkeklerin dişilerden daha fazla hassas olduğunu göstermektedir (Tablo 3.7).

Tablo 3.6'da gösterildiği gibi gruplar arasında doz artışına bağlı bir artma veya azalma gözlenmemiş ancak tüm gruplarda kontrole göre önemli bir artış meydana gelmiştir. En fazla artışın 10 µg/ml NF ve 10µg/ml NF+100 µg/ml C vitamini verilen dozda olduğu ve NF'nin en yüksek konsantrasyonu uygulanan grubun ekspresyon seviyesinin azaldığı, C vitaminin de bu azalmayı desteklediği

bulunmuştur. Uğuz ve ark., (2009)'nın yaptığı çalışmaya göre de NF miktarına bağlı olarak NF'nin farklı sonuçlar doğurduğu çalışmamızdaki sonuçlarla örtüşmektedir. Sonuç olarak da, apoptotik değişikliklere karşı koruyucu etkisi olan *bcl-XL* proteininin NF'nin öldürücü olmayan dozunda arttığı, öldürücü olan dozunda ise azalmaya neden olduğu bulunmuştur.

Yapılan diğer araştırmalara bakıldığında NF ile *bcl-XL* gen ekspresyon değişimi arasındaki ilişki hakkında çalışma yapılmadığı görülmüştür. Sadece NF gibi endokrin yıkıcı olan OF'nin testis embriyo hücrelerinde apoptozise yönelimin açık bir şekilde arttığı, *bcl-XL* mRNA ekspresyonunun doza bağlı olarak azaldığı rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2004). Ayrıca, Ito ve ark., (2013), öldürücü madde olan 4,5-dikloro-2-*n*-oktil-3(2H)-izotiyazolon (Sea-Nine 211)'nin balıklar üzerindeki kistlerdeki *kaspaz 2, 3, 6* ve *8* ekspresyonunun önemli bir şekilde arttığı, anti-apoptotik protein olan *bcl-XL*'nin sinyal yoğunluğunun azaldığı rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmalar da zararlı olan maddelerin canlılar üzerinde *bcl-XL* gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmektedir. Çalışmamızda da *bcl-XL* gen ekspresyon seviyesinin en yüksek NF konsantrasyonunda azalıyor olması, hücrelerin apoptozise yöneldiğini kanıtlamaktadır.

DNA tamir mekanizmasında, apoptozis, genetik stabilite ve özellikle hücre döngüsü kontrol noktasında önemli düzenleyici rol oynayabilen *p53* geninin ekspresyon düzeyleri, gruplar arasındaki (Tablo 2.1) farklılıklara göre incelendiğinde, sadece NF uygulanan gruplarda ekspresyonun azalması hücrelerdeki tahribatın arttığını ve hücrenin apoptozise doğru gittiğini göstermekte, C vitaminin de bu durumu ağırlaştırdığı (Tablo 3.8) görülmektedir. Cinsiyete bağlı olarak beyin dokusunda dişi gruplarda *p53* ekspresyonu uyarılırken, erkek gruplarda baskılanmaktadır. Cinsiyet gözetmeksizin görülen en önemli farklılık karaciğer dokusunda meydana gelen NF'nin artan dozuna bağlı olarak *p53* gen ekspresyonunun baskılanmasıdır (Şekil 3.16; Tablo 3.9). Sadece dişi beyin dokusunda Şekil 3.13'de görülen değişikliğe göre, *p53* gen ekspresyonunun önce en düşük dozda yüksek olması NF'nin artan dozuna bağlı olarak hücrelerin apoptotik yola doğru gittiğini göstermektedir.

Min ve ark., (2003) 17β -östradiol ve NF varlığında Japon balıklarında *p53* geninin ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Kimyasallara 10 gün muamele edilen hem dişi hem de erkek balıklarda 2 günde *p53* gen ekspresyon seviyesinin maximum değerlere ulaştığı, fakat daha sonraki günlerde zamana bağlı olarak, yavaş yavaş azaldığı bildirilmiştir. Yine aynı şekilde (Lee ve ark., 2008), BFA, NF ve OF'nin de *p53*'ün ekspresyon seviyesinin 3 saat muamele sonrasında önemli derecede arttığı, 96 saat muamele sonrasında ise ekspresyonun önemli derecede azaldığı rapor edilmiştir.

Apoptotik süreçler, çekirdek ve DNA parçalanması, mikro çekirdek oluşumu gibi olguları içerdiği ve hücrede var olan apoptozis ilişkili marker olan *p53*, *bax*, *p21* ekspresyonunun arttığı (Abarikwu ve Farombi, 2015) ve *Tigriopus japonicus* sucül türde NF, OF ve BFA maruziyetinden sonra *p53* gen ekspresyonunun önemli derecede uyarıldığı rapor edilmektedir (Hwang ve ark., 2010). Yapılan çalışmalar bu çalışmadaki sonuçları desteklemektedir.

Tez çalışmamızda, tümör nekrozis faktör alfa (*tnf- α*) gen ekspresyon düzeyinde gruplar arasındaki farklılıklar incelendiğinde, erkek ve dişi beyin dokusunda ve özellikle de erkek ratlarda hasarın daha fazla olduğu Tablo 3.11'de gösterilmiştir. *Tnf- α* gen ekspresyon düzeylerinde doz artışına bağlı olarak orantısal bir artış ve azalış görülmemiştir (Tablo 3.10).

Kapitanović ve ark., (2014)'nin yaptığı çalışmada kolon tümörlerinde *tnf- α* mRNA ekspresyonunun tümör dokulu hastalarda önemli derecede yüksek bulunduğu ve dağınık kolon kanser sürecinde bağışıklık düzenleyici genlerden biri olarak *tnf- α* 'nın rolünün büyük olduğu bildirilmiştir. Hung ve ark., (2010) tarafından NF ve 4-OF ile muamele edilen hücrelerde *tnf- α* gen ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. *Tnf- α* ekspresyonunu artışının önemli bir şekilde histon asetiltransferaz inhibitörü tarafından baskılandığı rapor edilmektedir. BFA ile muamele edilmiş farelerde de *tnf- α* 'nın arttığı ve fare karaciğer dokusunda zararlı etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir (Yang ve ark., 2006). Yapılan bu çalışmalarda çalışmamızdaki öldürücü olmayan dozun *tnf- α* gen ekspresyonu artırdığı ile örtüşmektedir.

NF'nin sitokin üretimi ve immun sistem fonksiyonu üzerindeki etkisi açık değildir. Fare makrofajlarında *tnf-α* üretimi ve *tnf-α* gen ekspresyonu üzerindeki NF'nin etkileri araştırılmış, *tnf-α* üretimini etkilediği, doza bağlı durumlarda *tnf-α* mRNA seviyelerini inhibe ettiği ve NF'nin immun sistem fonksiyonunun gelişimini etkileyebildiği rapor edilmiştir (You ve ark., 2002). Bu çalışma da, bu tez çalışmasında *tnf-α* gen ekspresyon seviyesinde doza bağlı görülen artış ve azalışları desteklemektedir.

Şöyle ki; Xia ve ark., (2013) tarafından dişi ratların dalak ve boyun altı bezinde oral yolla alınan NF'ye maruz kalan dişi ratların dalak ve boyun altı bezinde bağışıklık sisteminde olumsuz etkilere neden olabileceği ancak immün sistem üzerindeki NF'nin etkilerinin halen tam olarak açıklanmadığı rapor edilmektedir. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda NF'nin *tnf-α* gen ekspresyonuna olası etkisinin bulunması, immün sistem üzerindeki halen tam olarak açıklanmayan NF'nin etkilerinin belirlenebilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Golovko ve ark., (2005) *tnf-α*'nın prostat kanser hücrelerinde apoptozise ve hücre büyümesinin önlenmesine neden olabileceğini, *tnf-α* ve reseptörlerinin prostat kanserinde eksprese olduğu, D vitamininde bu sitokinlerin prostat kanserinde hücre gelişimini düzenlediği bildirilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda C vitamininin *tnf-α* gen ekspresyonu üzerine etkisi belirlenmemiştir. Çalışmamızdaki sonuçlar değerlendirildiğinde ise, yüksek NF konsantrasyonunda, C vitamininin hücrelerde hasarı ağırlaştırdığı, ancak düşük NF konsantrasyonun da iyileştirici etkisi olduğu bulunmuştur.

Marin ve ark., (2008) NF'nin letal ve subletal etkileri dişi ve erkek midyelerde değerlendirilmiş ve ilginç bir şekilde erkeklerin NF'ye dişilerden daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (Marin ve ark., 2008). Bu araştırma çalışmamızdaki *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *p53* ve *tnf-α* gen ekspresyon düzeylerinin tüm veri sonuçları değerlendirildiğinde erkek ve dişilerde görülen farklılıkları desteklemektedir.

5. SONUÇ

Ksenobiyotik kimyasalların, insanlar ve ekosistem üzerindeki tüm canlıları etkilediği, hormonların sentezine, metabolizmasına ve hareketlerine engel olduğu bilinmektedir. Alkilfenoller plastik katkı maddeleri ve yüzey aktif maddeleri olarak genişçe kullanılan potansiyel endokrin yıkıcı kimyasallardır. NF'nin östrojenik bir bileşik olduğu ve genellikle nonilfenol etoksilatlarının üretiminde kullanıldığı bilinmektedir. NFE'ler iyonik olmayan yüzey aktif maddesi olarak plastiklerde, latex, boya, kayganlaştırma yağları, emülsiyonlaştırıcılar, kağıt ve tekstil sanayilerinde ve ev ve endüstriyel deterjanlarda bulunabilmektedir (Dobrzyńska, 2014)

AFE'ler toksik çevresel öncü kirletici olarak gıdalardan, sulardan ve havadan canlı bünyesine alınmakta ve geniş bir kullanım alanına sahip olduğundan, canlılığın devamı için tehdit oluşturmaktadır (Xiec ve ark., 2013). Bu durumda insan ve doğada yaşayan tüm canlıların sürekli maruz kalabildiği, endokrin yıkıcı özelliği ve östrojen benzeri yapıya sahip olmasıyla öneminin günden güne arttığı NF'nin gen ekspresyon düzeylerini değiştirme potansiyeli üzerindeki etkisinin bilinmesi önemlidir.

Çalışmamızda kullanılan apoptotik ve anti-apoptotik genlerle (*kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *p53* ve *tnf-α*) yapılan araştırmalarla, çalışmamızın sonuçları paralellik göstermektedir. Ancak yapılan çalışmaların hemen hemen hepsinde NF oral yolla canlılara verilirken, bu tez çalışmamızda da solunum yoluyla verilmiştir. Gen ekspresyon düzeylerinden elde edilen bulguların diğer çalışmalarla paralellik gösterdiği görülmüş ve NF'nin solunum yoluyla da canlı bünyesine girebildiği ve beyin ve karaciğer hücrelerinde hasar oluşturduğu belirlenmiştir.

NF'nin gen düzeyindeki etkisinin belirlenebilmesi için, çalışmamızda *kaspaz-3*, *bcl-2*, *bcl-XL*, *p53* ve *tnf-α* genlerinin birbiriyle etkileşimi de dikkate alınarak ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

- Bu tez çalışmasında, *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin doz artışına paralel olarak *kaspaz-3* gen ekspresyon düzeyinin arttığı ve C vitaminin etkisiyle *kaspaz-3*'ün daha fazla eksprese olduğu yani C vitaminin NF'nin etkisini artırdığı bulunmuştur. Cinsiyet gözetmeksizin bakıldığında da beyin dokusundaki hasarın karaciğerden daha fazla olduğu bulunmuştur.
- Anti-apoptotik *bcl-2* gen ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin ekspresyon düzeylerini azalttığı, C vitaminin de NF'nin etkisini artırdığı yani ekspresyon seviyesinde daha fazla azalma olduğu, görülen en önemli azalmanın ise dişi ratların beyin dokusunda meydana geldiği bulunmuştur.
- Apoptotik değişikliklere karşı koruyucu olan *bcl-XL* gen ekspresyon düzeyleri deney gruplarındaki farklılıklar incelendiğinde *bcl-XL* gen ekspresyonunun dişi gruplarda arttığı, erkek gruplarda ise azaldığı NF'ye erkeklerin dişilerden daha fazla hassas olduğu ortaya çıkarılmıştır.
- Hücrede çok önemli düzenleyici rol oynayabilen *p53* geninin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, NF'nin tüm gruplarda gen ekspresyon seviyesini azalttığı, C vitaminin de bu etkiyi arttırdığı bulunmuştur.
- Tümör nekrozis faktör alfa (*tnf-α*) gen ekspresyon düzeyini incelendiğinde, cinsiyet gözetmeksizin beyin dokusunda ve erkek ratlarda hasarın daha fazla olduğu ancak *tnf-α* gen ekspresyon düzeylerinde doz artışına bağlı olarak orantısız bir artış ve azalış görülmediği bulunmuştur.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında elde edilen veriler, apoptotik ve anti-apoptotik genlerin düzeylerinin belirlenmesi ile NF'nin hücresel düzeydeki etkisinin bilinmesine, bunun sonucu olarak da NF'nin hangi hücresel yolları etkilediğinin açığa kavuşmasıyla, oluşabilecek hastalıkların önceden teşhis edilmesine veya hastalıkların tedavisi için yararlı bilgiler sunabileceğine katkı sağlayacaktır.

ÖZET

Ratlarda Kronik Nonilfenol ve C Vitamini Uygulamasının Gen Ekspresyon Düzeyine Etkisi

Öncü toksik çevresel kirletici ve endokrin yıkıcı kimyasallardan biri olan alkilfenol etoksilatları (AFE) tüm canlıları tehdit etmektedir. AFE, temizlik ürünleri, boya, ot ve böcek ilaçları gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşenleridir. AFE'nin parçalanma ürünü olan nonilfenol (NF), ev ve endüstriyel ürünlerin formülasyonunda yaygın olarak kullanılan en önemli ara ürünü temsil etmektedir. NF, boyalarda, tekstilde, kişisel bakım ürünlerinde ve plastiklerde bolca bulunmaktadır. Çevrede var olması ve toksik etkiye sahip olması NF'nin önemini artırmaktadır. Bu çalışmada doğada bulunan miktarı göz önüne alınarak, NF'nin etkisi ve kuvvetli antioksidan özellikli ve günlük vücuda alınması gereken C vitamini'nin NF'ye karşı koruyucu etkisinin olup olmadığı gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ile araştırılmıştır. Gen ekspresyonunda fiziksel değişiklikleri görebilmek için, hedef mRNA'nın göreceli miktarı belirlenmiş ve real-time PCR'dan elde edilen floresan veriler, veri analiz metoduna göre değerlendirilmiştir. NF'nin doza bağlı olarak, apoptotik *kaspaz-3* geninin ekspresyon düzeyini artırdığı, buna karşılık anti-apoptotik *bcl-2* geninin ekspresyon düzeyini azalttığı ve C vitamininin her iki durumda da NF'nin etkisini artırdığı ortaya konulmuştur ($p<0,05$). Ayrıca, NF doza bağlı olarak *p53* gen ekspresyon düzeyini tüm deney gruplarında azaltırken, *bcl-XL* gen ekspresyon düzeyini dişi ratlarda artırmış fakat erkek ratlarda azaltmıştır. Sonuç olarak, NF doza bağlı olarak apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerini artırırken, anti-apoptik genlerin ekspresyon düzeylerini azalttığı ve C vitamininin de her iki durumda da NF'nin etkisini artırdığı ortaya çıkarılmıştır.

Anahtar kelimeler: Nonilfenol, C vitamini, gen ekspresyonu, rat

ABSTRACT

The Chronic Effects of Nonylphenol and Vitamin C on the Level of Gene Expression

Alkylphenol ethoxylates (APEs) which are one of precursor toxic environmental pollutants and endocrine-disrupting chemicals threaten all living creatures. APEs are surfactants that are used in products such as paint, cleaning products, herbicides and pesticides. Nonylphenol (NF), which is the degradation product of APE stands out as the most important intermediate product that is widely used in formulation of household products and industrial products. Paints, textile products, personal care products and plastics are abundant in NF. Being available in the environment and having a toxic effect increase the importance of NF. In this thesis, it was sought to determine whether environmentally relevant concentration of NP has an effect on the expression of genes that regulates apoptosis. In order to determine the level of changes in the gene expression, relative quantity of the target mRNA has been determined and fluorescent data coming from real-time PCR have been assessed in line with the data analysis method. Results indicated that NP caused a significant increase in the expression of apoptotic *caspase-3* gene, while it caused a significant decrease in the expression of anti-apoptotic *bcl-2* genes in a dose dependent manner and the vitamin C enhanced the effects of NP in both cases ($p < 0.05$). Moreover, NP caused a dramatic decrease in the expression of *p53* genes in all treatment groups, whereas it caused a dramatic rise in the expression *bcl-XL* gene in females but not in males. In conclusion, while NP induced the expression of apoptotic gene, it inhibited anti-apoptotic genes and vitamin C had been shown to accelerate the NP-induced effects in both cases.

Key words: Nonylphenol, vitamin C, gene expression, rat

KAYNAKLAR

- ABARIKWU, S. O., FAROMBI, E. O. (2015). Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of *Bax/Bcl-2* ratio and caspase-3-dependent pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **118**: 90-98.
- ABARIKWU, S. O. (2014). Protective Effect of Quercetin on Atrazine-Induced Oxidative Stress in the Liver, Kidney, Brain, and Heart of Adult Wistar Rats. *Toxicol Int.*, **21(2)**: 148-155.
- ADEMOLLO, N., FERRARA, F., DELISE, M., FABIETTI, F., FUNARI, E. (2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment International*, **34**: 984-987.
- AITKEN, R. J., ROMAN, S. D. (2008). Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, edited by C. Yan Cheng. ©2008 Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. Chapter 9.
- ALY, H., DOMÈNECH, Ò. VE BANJAR, Z. M. (2012). Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **261**: 134-141.
- AN, B-S., KANG, S. K., SHIN, J-H., JEUNG, E-B. (2002). Stimulation of calbindin-D9k mRNA expression in the rat uterus by octyl-phenol, nonylphenol and bisphenol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **191**: 177-186.
- AOKIA, M., KURASAKIA, M., SAİTOB, T., SEKIA, S., HOSOKAWAC, T., TAKAHASHİ, Y., FUJİTA, H., IWAKUMA, T. (2004). Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life Sciences*, **74**: 2301-2312.
- AYDOGAN, M., KORKMAZ, A., BARLAS, N., KOLANKAYA, D. (2008). The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats. *Toxicology*, **249**: 35-39.
- AYDOGAN, M., KORKMAZ, A., BARLAS, N., KOLANKAYA, D. (2010). Pro-oxidant effect of vitamin C coadministration with bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol on the reproductive tract of male rats. *Drug and Chemical Toxicology*, **33(2)**: 193-203.

- BALAKRISHNAN, B., THORSTENSEN, E., PONNAMPALAM, A., MITCHELL, M.D. (2011). Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*, **32**: 788-792.
- BALDWIN, W.S., ROLING, J. A., PETERSON, S., CHAPMAN, L. M. (2005). Effects of nonylphenol on hepatic testosterone metabolism and the expression of acute phase proteins in winter flounder (*Pleuronectes americanus*): Comparison to the effects of Saint John's Wort *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140**: 87-96.
- BOLGER, R., WIESE, T.E., ERVIN, K., NESTICH, S., CHECOVICH, W. (1998). Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ. Health Perspect.*, **106(9)**: 551-557.
- BOYACIOĞLU, M., ARSLAN, ÇAKAL, Ö., PARLAK, H., KARAASLAN, M. (2007). Mutagenicity of nonylphenol and octylphenol using salmonella mutation assay., *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences, Cilt/Volume **24**, Sayı/Issue **(3-4)**: 299-302.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T., PFAFFL, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, **34**: 597-601.
- CARNEY, E.W., HOBERMAN, A.M., FARMER, D.R., KAPP, R.W., NIKIFOROV, A.I., BERNSTEIN, M., HURTT, M.E., BRESLIN, W.J., CAAGEN, S.Z., DASTON, G.P. (1997). Estrogen Modulation: Tiered Testing for Hazard Evaluation. *American Industrial Health Council. Reprod. Toxicol.*, **11(6)**: 879-92.
- CHANG, L-L., WUNC, W-S. A., WANGA,P. S. (2012). Effects of nonylphenol on aldosterone release from rat zona glomerulosa cells. *Chemico-Biological Interactions*, 195: 11-17.
- CHANG, L-L., WUNB, W-S. A. VE WANG, P. S. (2014). Recovery from developmental nonylphenol exposure is possible for female rats. *Chemico-Biological Interaction*, **221**: 52-60.
- CHEN, M-L., CHANG, C-C., SHEN, Y-J., HUNG, J-H., GUO, B-R., CHUANG H-Y., MAO I-F. (2008). Quantification of prenatal exposure and maternal-fetal transfer of nonylphenol. *Chemosphere*, **73**: S239-S245.
- CHEN, J-Q., BROWN, T. R., RUSSO, J. (2009). Regulation of energy metabolism pathways by estrogens and estrogenic chemicals and potential implications in

obesity associated with increased exposure to endocrine disruptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1793**: 1128-1143.

- CHEN, J., BRUNS, A. H., DONNELLY, H. K., WUNDERINK, R. G. (2010). Comparative in vitro stimulation with lipopolysaccharide to study *TNF- α* gene expression in fresh whole blood, fresh and frozen peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Immunological Methods*, **357**: 33-37.
- CHEN, L., LUO, Y., LIU, T., YUAN, Y., GU, H., YANG, Y., LI, L., TAN, L. (2015). Label-free electrochemical immunoassay of Bcl-2 protein expression on tumor cells. *Talanta*, **32**: 479-485.
- CHITRA, K. C., MATHUR, P. P. (2004). Vitamin E prevents nonylphenol-induced oxidative stress in testis of rats. *Indian J Exp Biol.*, **42(2)**: 220-3.
- CHIPUK, J. E., MOLDOVEANU, T., LAMBI, F., PARSONS, M., J., GREEN, D.,R. (2010). The BCL-2 Family Reunion. *Molecular Cell*, **37**.
- CHOI, J-S., OH, J-H., PARK, H-J., CHOI, M-S., PARK, M-Y., KANG, S-J., OH, M-J., KIM, S-J., HWANG, S-Y., YOON, S. (2011). miRNA regulation of cytotoxic effects in Mouse Sertoli cells exposed to nonylphenol. *Choi et al. Reproductive Biology and Endocrinology*, **9**: 126.
- COOK, J.C., KAPLAN, A.M., DAVIS, L.G., OCONNOR, J.C. (1997). Development of a Tier 1 Screening Battery for Detecting Endocrine-Active Compounds (EACs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**: 60-68.
- ÇAKMAK, G., TOGAN, İ., UĞUZ, C., SEVERCAN, F. (2003). Rainbow trout livers exposed to nonylphenol display extensive structural and compositional changes on infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, **57(7)**: 1-7.
- ÇETİNKAYA, S. (2009). Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, Cilt: 36, Sayı: **1**: 59-66.
- DEL PUERTO, H. L., MARTINS, A. S., MORO, L., MILSTED, A., ALVES, F., BRAZ, G. F., VASCONCELOS, A. C. (2010). Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virüs. *Genet. Mol. Res.*, **9(1)**: 151-161.
- DENSLOW, N. D., LEE, H. S., BOWMAN, C. J., HEMMER, M. J., FOLMAR, L. C. (2001). Multiple responses in gene expression in fish treated with Estrogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **129**: 277-282.

- DIAMANTI-KANDARAKIS, E., BOURGUIGNON, J-P., GIUDICE, L. C., HAUSER, R., PRINS, G. S., SOTO, A. M., ZOELLER, R. T., GORE, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, **30(4)**: 293-342.
- DIANA, A., DIMITRA, V. (2011). Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Material*, **185**: 281-286.
- DIEHL, J., JOHNSON, S.E., XIA, K., WEST, A., TOMANEK, L. (2012). The distribution of 4-nonylphenol in marine organisms of North American Pacific Coast estuaries. *Chemosphere*, **87**: 490-497.
- DOBRYŃSKA, M. (2014). DNA damage in organs of female and male mice exposed to nonylphenol, as a single agent or in combination with ionizing irradiation: A comet assay study. *Mutation Research*, **772**: 14-19.
- DONG, Y., WANG, J., FENG, D., QIN, H., WEN, H., YIN, Z., GAO, G., LI, C. (2014). Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Int. J. Med. Sci.*, **11(3)**: 282-290.
- DURUSOY, R., KARABABA, A.O. (2011). Plastik gıda ambalajları ve sağlık. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, **10(1)**.
- EL-ASHKER, M., ABDELHAMID, F., RISHA, E., SALAMA, M., EL-SEBAEI, M. (2015). Vitamin C Ameliorates Gentamicin-Induced Acute Kidney Injury in Equines: An Experimental Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, **35**: 238-243.
- ERGÜN, S. S., ÜSTÜNER, B., ALÇAY, S., SAĞIRKAYA, H., UĞUZ, C. (2014). The Effects of Nonylphenol on Gamete Physiology in Bovine. *Journal of Applied Biological Sciences*, **8(2)**: 32-38.
- FORMAN, D., AMES, B. (1991). The Ames Test and the Causes of Cancer. *Br. Med. J.*, Vol. **303**: 428-429.
- GEORGE, P. (2011). p53 how crucial is its role in cancer?. *International Journal Of Current Pharmaceutical Research*, **3(2)**: 0975-7066.
- GILDA, J. E., GOMES, A. V. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Analytical Biochemistry*, **440**: 186-188.
- GIULIETTI, A., OVERBERGH, L., VALCKX, D., DECALLONNE, B., BOUILLON, R., MATHIEU, C. (2001). An Overview of Real-Time

Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, **25**: 386-401.

- GYLLENHAMMAR, I., GLYNN, A., DARNERUD, P. O., LIGNELL, S., DELFT, R., AUNE, M. (2012). 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environment International*, **43**: 21-28.
- GOIDIN, D., MAMESSIER, A., STAQUET, M-J., SCHMITT, D., BERTHIER-VERGNES, O. (2001). Ribosomal 18S RNA Prevails over Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and β -Actin Genes as Internal Standard for Quantitative Comparison of mRNA Levels in Invasive and Noninvasive Human Melanoma Cell Subpopulations. *Analytical Biochemistry*, **295**: 17-21.
- GOLOVKOA, O., NAZAROVAA, T. N., TUOHIMAA, P. (2005). Vitamin D-induced up-regulation of tumour necrosis factor alpha (*TNF- α*) in prostate cancer cells. *Life Sciences*, **77**: 562-577.
- GONG, Y., HAN, X. D. (2006). Nonylphenol-induced oxidative stress and cytotoxicity in testicular Sertoli cells. *Reproductive Toxicology*, **22**: 623-630.
- GONG, Y., WU, J., HUANG, Y., SHEN, S., HAN, X. (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology Letters*, **186**: 84-95.
- HAN, X. D., TU, Z. G., GONG, Y., SHEN, S. N., WANG, X.Y., KANG, L. N., HOU, Y. Y., CHEN, J. X. (2004). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive Toxicology*, **19**: 215-221.
- HENSE, B. A., WELZL, G., SEVERIN, G F., SCHRAMMC, K-W. (2005). Nonylphenol induced changes in trophic web structure of plankton analysed by multivariate statistical approaches. *Aquatic Toxicology*, **73**: 190-209.
- HEDENFALK, I. A., RINGNER, M., TRENT, J. M., BORG, A. (2002). Gene Expression in Inherited Breast Cancer. *Preprint version of Advances in Cancer Research*, **84**: 1-34.
- HERNÁNDEZ, R. G., ZUMBADOA, M., LUZARDO, O. P., MONTERDE, J. G., BLANCO, A., BOADA, L. D. (2007). Multigenerational study of the hepatic effects exerted by the consumption of nonylphenol- and 4-octylphenol-contaminated drinking water in Sprague-Dawley rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **23**: 73-81.

- HERNANDEZ, J. P., CHAPMAN, L. M., KRETSCHMER, X. C., BALDWIN, W. S. (2006). Gender-specific induction of cytochrome P450s in nonylphenol-treated FVB/NJ mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **216**: 186-196.
- HOSSAINI, A., DALGAARD, M., VINGGAARD, A. M., FRANDBSEN, H., LARSEN, J-J. (2001). In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*, **15**: 537-543.
- HUNG, C-H., YANG, S-N., KUO, P-L., CHU, Y-T., CHANG, H-W., WEI, W-J., HUANG, S-K., JONG, Y-J. (2010). Modulation of Cytokine Expression in Human Myeloid Dendritic Cells by Environmental Endocrine-Disrupting Chemicals Involves Epigenetic Regulation. *Environmental Health Perspectives*, **118(1)**: 67-72.
- HWANG, D-S., LEE, J-S., RHEE, J-S., HAN, J., LEE, Y-M., KİM, I-C., PARK, G. S., LEE, J., LEE, J-S. (2010). Modulation of *p53* gene expression in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to alkylphenols. *Marine Environmental Research*, **69**: S77-S80.
- IDE, K., YAMADA, H., UMEGAKI, K., MIZUNO, K., KAWAKAMI, N., HAGIWARA, Y., MATSUMOTO, M., YOSHIDA, H., KİM, K., SHIOSAKI, E., YOKOCHI, T., HARADA, K. (2015). Lymphocyte vitamin C levels as potential biomarker for progression of Parkinson's disease. *Nutrition*, **31**: 406-408.
- ISHIDOA, M., MORITAA, M., OKA, S., MASUO, Y. (2005). Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regulatory Peptides*, **126**: 145-153.
- İŞCAN, M., TOGAN, İ., SEVERCAN, F., UĞUZ, C., ve ERGÜVEN, A. (2005). Sakarya Nehri ve Değirmenderesi'nde Alkilfenol Kirliliği ve Nonilfenol'ün Alabalıklar (*Onchoryncus Mykiss*) Üzerine Etkileri. *The Scientific and technical Research Council of Turkey*, **286**.
- İŞCAN, M., TOGAN, İ., TABAK, İ., UĞUZ, C., ERGÜVEN, A., EROĞLU, Y., ZENGİN, M., AKTAŞ, M. ve ZENGİN, B. (2001). Deniz ve Akarsulardaki Kirliliğin Karadeniz'deki Ekonomik Değeri Yüksek Balıkların Stok ve Üremesi Üzerine Olan Etkisinin Belirlenmesi. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. TAGEM / HAYSÜD /98/12/02/00.
- ITO, M., MOCHIDA, K., ITO, K., ONDUKA, T., FUJII, K. (2013). Induction of apoptosis in testis of the marine teleost mummichog *Fundulus heteroclitus*

after in vivo exposure to the antifouling biocide 4,5-dichloro-2-n-octyl-3(2H)-isothiazolone (Sea-Nine 211). *Chemosphere*, **90(3)**: 1053-1060.

JIN, X., WANG, J., ZHU, L., WANG, L., DAN, H., ZENG, X., CHEN, Q. (2012). Association between-308 G/A polymorphism in *TNF- α* gene and lichen planus: A meta-analysis. *Journal of Dermatological Science*, **68**: 127-134.

JUBENDRADASS, R., D'CRUZ, S. C., MATHUR, P. P. (2011). Short-term exposure to nonylphenol induces pancreatic oxidative stress and alters liver glucose metabolism in adult female rats. *J Biochem Mol Toxicol.*, **25(2)**:77-83.

JUBENDRADASS, R., D'CRUZ, S. C., RANI, S. J. A., MATHUR, P P. (2012). Nonylphenol induces apoptosis via mitochondria- and Fas-L-mediated pathways in the liver of adult male rat. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **62**: 405-411.

JUNG, J-H., SHIM, W. J., ADDISON, R. F., BAEK, J. M., HAN, C-H. (2006). Protein and gene expression of VTG in response to 4-nonylphenol in rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **143**:162-170.

KALENDAR, R., LEE, D., SCHULMAN, A. H. (2009). FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes. Genomes and Genomics*, **3(1)**: 1-14.

KANAUCHI, H., WADA, N., CLARK, O. H., DUH, Q-Y. (2002). Apoptosis regulating genes, *bcl-2* and *bax*, and human telomerase reverse transcriptase messenger RNA expression in adrenal tumors: *Possible diagnostic and prognostic importance*, Volume **132**, Number 6.

KAPITANOVIĆ, S., ČAČEV, T., IVKOVIĆ, T. C., LONČAR, B., ARALICA, G. (2014). *TNF- α* gene/protein in tumorigenesis of sporadic colon adenocarcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*, **97**: 285-291.

KARADENİZ, H., UĞUZ, C., CALIŞKAN, A. (2010). Electrochemical Monitoring of the Interaction between 4-Nonylphenol and DNA by Graphite and Carbon Nanotube Modified Graphite Electrodes, *Analytical Sciences*, **26**:1065-1069.

KAUFMAN, R. J. (2000). Overview of Vector Design for Mammalian Gene Expression. *Molecular Biotechnology*, Design 151, Volume **16**.

- KIM, S-K., LEE, H-J., YANG, H., KIM, H-S., YOON, Y-D. (2004). Prepubertal Exposure to 4-Tert-Octylphenol Induces Apoptosis of Testicular Germ Cells In Adult Rat. *Arch. Androl.*, **50(6)**: 427-441.
- KIM, E., MA, W-L., LIN, D-L., INUI, S., CHEN, Y-L., CHANG, C. (2007). TR4 orphan nuclear receptor functions as an apoptosis modulator via regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **361**: 323-328.
- KINNBERG, K., KORSGAARD, B., BJERREGAARD, P. (2000). Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Marine Environmental Research*, **50**: 169-173.
- KHAKSARI, M., HAJIALIZADEH, Z., SHAHROKHIC, N., ESMAEILI-MAHANID, S. (2015). Changes in the gene expression of estrogen receptors involved in the protective effect of estrogen in rat's traumatic brain injury. *Brain Research*, **1618**: 1-8.
- KORKMAZ, A., AHBAB, M., KOLANKAYA, D., BARLAS, N. (2010). Pro-oxidant effect of vitamin C co-administration with Bisphenol A, nonylphenol and octylphenol on liver of male rats. *Food and Chemical toxicology*, **48**: 2865-2871.
- KORKMAZ, A., AYDOĞAN, M., KOLANKAYA, D., BARLAS, N. (2011). Vitamin C coadministration augments bisphenol A, nonylphenol, and octylphenol induced oxidative damage on kidney of rats. *Environmental Toxicology*, **26(4)**: 325-337.
- KORTNER, T. M., MORTENSEN, A.S., HANSEN, M. D., ARUKWE, A. (2009). Neural aromatase transcript and protein levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) are modulated by the ubiquitous water pollutant, 4-nonylphenol. *General and Comparative Endocrinology*, **164**: 91-99.
- LAURENZANA, E. M., BALASUBRAMANIAN, G., WEIS, C., BLAYDES, B., NEWBOLD, R. R., DELCLOS, K. B. (2002). Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal, and adult rats. *Chemico-Biological Interactions*, **139**: 23-41.
- LARMONIER, N., CATHELINA, D., LARMONIER, C., NICOLASA, A., MERINO, D., JANIKASHVILI, N., AUDIAA, S., BATEMANC, A., THOMPSOND, J., KOTTKE, T., HARTUNGE, T., KATSANIS, E., VILED, R., BONNOTTE, B. (2007). The inhibition of TNF- α anti-tumoral

properties by blocking antibodies promotes tumor growth in a rat model. *Experimental cell research*, **313**: 2345–2355.

- LEE, M. H., CHUNG, S. W., KANG, B. Y., Park, J., LEE, C. H., HWANG, S. Y., KIM, T. S. (2003). Enhanced interleukin-4 production in CD4⁺ T cells and elevated immunoglobulin E levels in antigen-primed mice by bisphenol A and nonylphenol, endocrine disruptors: involvement of nuclear factor-AT and Ca²⁺. *Immunology*, **109**: 76-86.
- LEE, M. H., KIM, E., KIM, T.S. (2004). Exposure to 4-tert-octylphenol, an environmentally persistent alkylphenol, enhances interleukin-4 production in T cells via NF-AT activation. *ToxicolAppl Pharmacol.*, **197(1)**: 19-28.
- LEE, Y-M., RHEE, J-S., HWANG, D-S., KIM, I-C., RAISUDDIN, S., LEE, J-S. (2008). *p53* gene expression is modulated by endocrine disrupting chemicals in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **147**: 150-157.
- LEE, C-C., JIANG, L-Y., KUO, Y-L., HSIEH, C-Y., CHEN, C-S., TIEN, C-J. (2013). The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. *Chemosphere*, **91**: 904-911.
- LI, D., KIM, M., SHIM, W. J., YIM, U. H., OH, J-R., KWON, Y-J. (2004). Seasonal flux of nonylphenol in Han River, Korea. *Chemosphere*, **56**: 1-6.
- LI, X., YING, G-G., ZHAO, J-L., CHEN, Z-F., LAI, H-J., SU, H-C. (2013). 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment International*, **52**: 81-86.
- LIAN, J., LIU, J. X., WEI, Y. S. (2009). Fate of nonylphenol polyethoxylates and their metabolites in four Beijing wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, **407**: 4261-4268.
- LIANG, Y., LIU, J., FENG, Z. (2013). The regulation of cellular metabolism by tumor suppressor p53. *Cell & Bioscience*, **3**:9.
- LINI, M. R., KURCHETI, P. P., BABU, G., PURUSHOTHAMAN, C. S. (2013). Effect of *Aeromonas hydrophila* Infection on *Caspase-3* Expression and Activity in Rohu, *Labeo rohita*. *J Aquac Res Development*, **4**:6.
- LITWA, E., RZEMIENIEC, J., WNUK, A., LASON, W., KRZEPTOWSKI, W., KAJTA, M. (2014). Apoptotic and neurotoxic actions of 4-para-nonylphenol

are accompanied by activation of retinoid X receptor and impairment of classical estrogen receptor signaling. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **144**: 334-347.

LIU, X., NIE, S., HUANG, D., XIE, M. (2014). Effects of nonylphenol exposure on expression of cell receptors and secretory function in mouse Sertoli TM4 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **37**: 608-616.

LOPEZ-ESPINOSA, M.J. FREIRE, C., ARREBOLA, J. P., NAVEA, N., TAOUFIKI, J., FERNANDEZ, M. F., BALLESTEROS, O., PRADA, R., OLEA, N. (2009). Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*, **76**: 847-852.

LU, Y-Y., CHEN, M-L., SUNG, F-C., WANG, P. S-G., MAO, I-F. (2007). Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environment International* **33**: 903-910.

LUKAC, N., LUKACOVA, J., PINTO, B., KNAZICKA, Z., TVRDA, E., MASSANYI, P. (2013). The effect of nonylphenol on the motility and viability of bovine spermatozoa in vitro. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **48**: 973-979.

LUOA, Q., BANB, M., ANDOA, H., KITAHASHIC, T. T., BHANDARIA, R. K., MCCORMICKD, S. D., URANO, A. (2005). Distinct effects of 4-nonylphenol and estrogen-17h on expression of estrogen receptor a gene in smolting sockeye salmon. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **140**: 123-130.

MAENG, S., JUNG, Y., CHOI, E., JEON, J-K., KIM, S., GEN, K., SOHN, Y. C. (2005). Expression of gonadotropin subunit genes following 4-nonylphenol exposure in masu salmon: Effects on transcript levels and promoter activities via estrogen receptor alpha. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **142**: 383-390.

MAO, Z., ZHENG, Y., ZHANG, Y., HAN, B., CHEN, L., LI, J., LI, F., SHAN, Q. (2008). Chronic application of nonylphenol-induced apoptosis via suppression of *bcl-2* transcription and up-regulation of active caspase-3 in mouse brain. *Neuroscience Letters*, **439**: 147-152.

MAO, Z., ZHENG, Y-L., ZHANG, Y-Q. (2011). Behavioral Impairment and Oxidative Damage Induced by Chronic Application of Nonylphenol. *Int. J. Mol. Sci.* **12**: 114-127.

- MARIN, M. G., RIGATO, S., RICCIARDI, F., MATOZZO, V. (2008). Lethal and estrogenic effects of 4-nonylphenol in the cockle *Cerastoderma glaucum*. *Marine Pollution Bulletin*, **57**: 552-558.
- MEKKAWY, I. A., MAHMOUD, U. M., SAYED, A. E. H. (2011). Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus*. *Tissue and Cell*, **43**: 223-229.
- MEUCCI, V., ARUKWE, A. (2005) Detection of vitellogenin and *zona radiata* protein expressions in surface mucus of immature juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to waterborne nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, **73**: 1-10.
- MICHAEL, D., KAHL, E. A., MAKYNEN, P., KOSIAN, A., GERALD, T. (1997). Toxicity of 4-Nonylphenol in a Life-Cycle Test with the Midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**: 155-160.
- MIDHILA, E. M., CHITRA, K. C. (2015). Nonylphenol-induced hepatotoxicity in the freshwater fish, *Oreochromis mossambicus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, Volume **5**, Issue 3.
- MIN, J., LEE, S-K., GU, M. B. (2003). Effects of endocrine disrupting chemicals on distinct expression patterns of estrogen receptor, cytochrome P450 aromatase and p53 genes in *Oryzias latipes* liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **17(5)**: 272-277.
- MOCHIDA, K., OHKUBO, N., MATSUBARA, T., ITO, K., KAKUNO, A., FUJIIA, K. (2004). Effects of endocrine-disrupting chemicals on expression of ubiquitin C-terminal hydrolase mRNA in testis and brain of the Japanese common goby. *Aquatic Toxicology*, **70**: 123-136.
- MOGGS, J. G. (2005). Molecular responses to xenoestrogens: Mechanistic insights from toxicogenomics. *Toxicology*, **213**: 177-193.
- MOLOGNI, L., NIELSEN, P. E., GAMBACORTI-PASSERINI, C. (1999). *In Vitro* Transcriptional and Translational Block of the *bcl-2* Gene Operated by Peptide Nucleic Acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **264**: 537-543.
- MORIMOTO, M., BOERKOEL, C. F. (2013). The Role of Nuclear Bodies in Gene Expression and Disease. *Biology* **2**: 976-1033.

- NAGAO, T., WADA, K., MARUMO, H., YOSHIMURA, S., ONO, H. (2001). Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reproductive Toxicology*, **15**: 293-315.
- NICE, H. E., THORNDYKE, M. C., MORRITT, D., STEELE, S., CRANE, M. (2000). Development of *Crassostrea gigas* Larvae is Affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*, **40(6)**: 491-496.
- NICE, H. E. (2005). Sperm motility in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affected by nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin* **50**: 1668-1674.
- NIU, Y., ZHANG, J., DUAN, H., WU, Y., SHAO, B. (2015). Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs: Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. *Food Chemistry*, **167**: 320-325.
- NG, S-Y., GUNNING, P., EDDY, R., PONTE, P., LEAVITT, J., SHOWS, T., KEDES, L. (1985). Evolution of the Functional Human 3-Actin Gene and Its Multi-Pseudogene Family: Conservation of Noncoding Regions and Chromosomal Dispersion of Pseudogenes. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 5, No. **10**: 2720-2732.
- OKA, H., SATOH, Y., KAWANO, N., YAGISHITA, S. KAMEYA, T. (1996). Expression of *Bcl-2* gene product in embryonal tumora of the central nervous system. *Surg. Neurol.*, 23: **45**:230-5.
- OLSVIK, P. A., LIE, K. K., STURVE, J., HASSELBERG, L., ANDERSEN, O. K. (2009). Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, 75: 360-367.
- PADAYATTY, S. J., KATZ, A., WANG, Y., ECK, P., KWON, O., LEE, J. H., CHEN, S., CORPE, C., DUTTA, A., DUTTA, S. K., LEVINE, M. (2003). Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *JAm Coll Nutr.*, **22(1)**: 18-35.
- PALERMO, F. A., COCCI, F., NABISSI, M., POLZONETTI-MAGNI, A., MOSCONI, G. (2012). Cortisol response to waterborne 4-nonylphenol exposure leads to increased brain POMC and HSP70 mRNA expressions and reduced total antioxidant capacity in juvenile sole (*Solea solea*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **156**: 135-139.
- PARK, K., KWAK, I-S. (2010). Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere* **79**: 934-941.

- PAXEUS, N., ROBINSON, P., BALMER, P. (1992). Study of Organic Pollutants In Municipal Wastewater in Gotenberg, Sweden. *Water Sci. Technol.*, **25**: 249-256.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. **29**, No. 9.
- PFAFFL, M. W., HORGAN, G. W., DEMPFLER, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. **30**, No. 9.
- POLLOCK, J. D. (2002). Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research. *Chemistry and Physics of Lipids*, **121**: 241-256.
- PRAJAPATI, P., SRIPADA, L. SINGH, K., BHATELIA, K., SINGH, R., SINGH, R. (2014). *TNF- α* regulates miRNA targeting mitochondrial complex-I and induces cell death in dopaminergic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1852**: 451-461.
- QIN, H., GUNNINGA, P. (1997). The 39-end of the human b-actin gene enhances activity of the b-actin expression vector system: construction of improved vectors. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **36**: 63-72.
- RAECKER, T., THIELE, B., BOEHME, R. M., GUENTHER, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* **82**: 1533-1540.
- RASTOGI, R. P., SINHA, R. R. P. (2009). Apoptosis: Molecular Mechanisms and Pathogenicity. *Excli Journal*, **8**: 155-181.
- REIS, M. I., R., NASCIMENTO, D. S., VALE, A., SILVA, M. T., SANTOS, N. M. S. (2007). Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) caspase-3 gene. *Molecular Immunology*, **44**: 774-783.
- RIVA, C., PORTE, C., BINELLI, A., PROVINI, A. (2010). Evaluation of 4-nonylphenol in vivo exposure in *Dreissena polymorpha*: Bioaccumulation, steroid levels and oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **152**: 175-181.
- ROBERTSON, L. S., MCCORMICK, S. D. (2012). The effect of nonylphenol on gene expression in Atlantic salmon smolts. *Aquatic Toxicology*, **122(123)**: 36-43.

- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J., ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C., CANO, M. P., ELEZ-MARTÍNEZ, P., MARTÍN-BELLOSO, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of functional foods*, **14**: 33-43.
- ROIG, B., CADIÈRE, A., BRESSIEUX, S., BIAU, S., FAURE, S., BARBARA, P. (2014). Environmental concentration of nonylphenol alters the development of urogenital and visceral organs in avian model. *Environment International*, **62**: 78-85.
- ROSTAMIZADEH, L., FAKHRJOU, A., MONTAZERI, V., ESTIAR, M. A., NAGHAVI-BEHZAD, M., HOSSEINI, S., SAKHINIA, M., SAKHINIA, E. (2013). *Bcl-2* Gene Expression in Human Breast Cancers in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol **14**.
- SABBIETIA, M. G., AGAS, D., PALERMO, F., MOSCONI, G., SANTONI, G., AMANTINI, C., FARFARIELLO, V., MARCHETTIA, L. (2011). 4-Nonylphenol triggers apoptosis and affects 17- β -Estradiol receptors in calvarial osteoblasts. *Toxicology*, **290**: 334-341.
- SAID, T. M., PAASCH, U., GLANDER, H-J., AGARWAL, A. (2004). Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction Update*, Vol.**10**, No.1 pp. 39-51.
- SALGUEIRO, G. N., LOPEZ, D. E., ALDA, M., MUNIATEGUI-LORENZO, S., PRADA-RODRIGUEZ, D., BARCELO, D. (2013). Determination of 13 estrogenic endocrine disrupting compounds in atmospheric particulate matter by pressurised liquid extraction and liquid chromatographytandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **405**: 8913-23.
- SANTAMARÍA, L., MARTÍN, R., GÓMEZ, V., INGELMO, I., LÓPEZ, C., REVESTIDO, R. (2005). Stereologic Estimation Of Ki-67, *Caspase 3* and Gstp1 Positive Cells in Prostate Lesions. *Image Anal Stereol.*, **24**: 77-84.
- SANZ, L., GARCIA-MARCO, J. A., CASANOVA, B., TERESA DE LA FUENTE, M., GARCIA-GILA, M., GARCIA-PARDO, A., SILVA, A. (2004). *Bcl-2* family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **315**: 562-567.
- SHANTHANAGOUDA, A. H., PATIL, J. G., NUGEGODA, D. (2013). Effects of exposure to oestrogenic compounds on aromatase gene expression are gender

dependent in the rainbowfish, *Melanotaenia fluviatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **157**: 162-171.

SHELLEY, L. K., ROSS, P. S., MILLER, K. M., KAUKINEN, K. H., KENNEDY, C. J. (2012). Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression. *Aquatic Toxicology*, **124(125)**: 217-226.

SHIMIZU, Y., MIYAZAKI, Y., IBUKI, K., SUZUKI, H., KANEYASU, K., GOTO, Y., HAYAMI, M., MIURA, T., HAGA, T. (2005). Induction of immune response in macaque monkeys infected with simian-human immunodeficiency virus having the TNF- α gene at an early stage of infection. *Virology*, **343**: 151-161.

SOARES, A., GUIEYSSE, B., JEFFERSON, B., CARTMELL, E., LESTER, J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, **34**: 1033-1049.

SOLOMON, G. M., SCHETTLER, T. (2000). Environment and health: 6. Endocrine disruption and potential human health implications. *CMAJ*, **163(11)**: 1471-6.

SONE, K., HINAGOA, M., KITAYAMAC, A., MOROKUMAC, J., UENOC, N., WATANABE, H., IGUCHI, T. (2004). Effects of 17- β -estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *General and Comparative Endocrinology*, **138**: 228-236.

SONG, B., XIE, B., WANG, C., LI, M. (2011). Caspase-3 is a target gene of c-Jun:ATF2 heterodimers during apoptosis induced by activity deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience Letters*, **505**: 76-81.

SUNG, H-H., YE, Y-Z. (2009). Effect of nonylphenol on giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment: Toxicity and messenger RNA expression of hemocyte genes. *Aquatic Toxicology*, **91**: 270-277.

SÜLLÜ, Y., KANDEMİR, B., YILDIZ, L., KARAGÖZ, F., BARIŞ, S., AYDIN, O. (2006). Germ hücreli testis tümörlerinde p53 ve bcl-2 Ekspresyonu. *Türk Patoloji Dergisi*, **22(3)**:181-186.

SYNDER, L., CHAMPNESS, W. (2007). Third Edition Moleküler Genetics of Bacteria. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University East Lansing, Michigan Washington, DC (492).

- TVRDÁ, E., KŇAŽICKÁ, Z., BÁRDOS, L., MASSÁNYI, P., LUKÁČ, N. (2011). Impact of Oxidative Stress on Male Fertility. *Acta Veterinaria Hungarica*, **59(4)**:465-484.
- TONG, Y., GENG, Y., XU, J., WANG, J., ZHANG, Y., LIN, L., ZHANG, R., DENG, P., LI, Y., HOU, W., CHAI, Y., MASON, K. A., LU, Z., CHENG, J. (2010). The role of functional polymorphisms of the *TNF- α* gene promoter in the risk of ischemic stroke in Chinese Han and Uyghur populations: Two case-control studies. *Clinica Chimica Acta.*, **411**: 1291-1295.
- TOPPARI, J., LARSEN, J., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE Jr, L., JEGOU, B., JENSEN, T., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT-DE-MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N. (1996). Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. *Environ. Health Perspec.*, **104(4)**: 741-803.
- TOYOOKA, T., KUBOTA, T., IBUKI, Y. (2012). Nonylphenol polyethoxylates induce phosphorylation of histone H2AX. *Mutation Research*, **741**: 57-64.
- TSUJIMOTO, Y. (2002). Bcl-2 Family of Proteins: Life-or-Death Switch in Mitochondria, *Bioscience Reports*, Vol. **22**, No. 1.
- UĞUZ, C., TOGAN, I., EROGLU, Y., TABAK, I., ZENGİN, M., ISCAN, M. (2003a). Alkylphenol concentrations in two rivers of Turkey. *Environ Toxicol Pharm*, **14**: 87-88.
- UĞUZ, C., İŞCAN, M., ERGÜVEN, A., TOGAN, İ. (2003b). The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effects on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Environmental Research*, **92(3)**:262-270.
- UĞUZ, C., VARISLI, O., AĞCA, C., AĞCA, Y. (2009). Effects of nonylphenol on motility and subcellular elements of epididymal rat sperm. *Reproduct. Toxicol.*, **28(4)**: 542-549.
- UĞUZ, C., VARIŞLI, O., AĞCA, C., AĞCA, Y. (2014A). Effects of Nonylphenol on Motion Kinetics, Acrosome and Mitochondrial Membrane Potential in Frozen-Thawed Bull Sperm, *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.* **20(4)**: 583-590
- UĞUZ, C., VARIŞLI, O., AĞCA, C., AĞCA, Y. (2014b). In vitro effects of nonylphenol on motility, mitochondrial, akrozomal and chromatin integrity of ram and boar spermatozoa, *Andrologia*, **3**:1:10.

- VELA-SORIA, F., BALLESTEROS, O., CAMINO-SÁNCHEZ, F.-J., ZAFRA-GÓMEZ, A., BALLESTEROS, L., NAVALÓN, A. (2015). Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-S/MS analysis. *Microchemical Journal*, **118**: 32-39.
- VESTIN, A., KHAZANOV, E., AVNI, D., SERGEYEV, V., BARENHOLZ, Y., SIDI, Y., YAKOBSON, E. (2008). siRNA-Lipoplex-Mediated *Bcl-2* and *Bcl-xL* Gene Silencing Induces Apoptosis in MCF-7 Human Breast Carcinoma Cells. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal*, **1**: 28-43.
- VETILLARD, A., FERRIERE, F., JEGO, P., BAILHACHE, T. (2006). Regulation of Salmon Gonadotrophin-Releasing Hormone Gene Expression by Sex Stereoids in rainbow Trout Brain. *Journal of Neuroendocrinology*, **18**: 445-453.
- VIVACQUA, A., RECCHIA, A.G., FASANELLA, G., GABRIELE, S., CARPINO, A., RAGO, V. (2003). The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine*, **22(3)**: 275-284.
- VURAL, N., DUYGU, Y. (1992). Ankara Çayının Anyonik ve Noniyonik Yüzey Aktif Madde Kirliliğinin Araştırılması. *Ankara Ecz. Fak. Der.* **21**: 1-2.
- WARHURST, A. M. (1995). An environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols. Friends of the Earth, London, UK.
- WEI, Y.-H., AND LEE, H.-S. (2002). Oxidative Stress, Mitochondrial DNA Mutation, and Impairment of Antioxidant Enzymes in Aging. *Experimental Biology and Medicine*, **227**: 671-682.
- WILLIAM, S., BALDWIN, S. E., GRAHAM, D. S., LEBLANC, G. A. (1997). Altered Metabolic Elimination of Testosterone and Associated Toxicity Following Exposure of *Daphnia magna* to Nonylphenol Polyethoxylate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **39**, 104-111.
- WILSON, N. K., CHUANG, J. C., MORGAN, M. K., LORDO, R. A., SHELDON, L. S. (2007). An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environmental Research*, **103**: 9-20.
- WONG, M. L., MEDRANO, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, **39**: 75-85.

- WU, M., XU, H., SHEN, Y., QIU, W., YANG, M. (2011). Oxidative Stress in Zebrafish Embryos Induced By Short-Term Exposure To Bisphenol A, Nonylphenol, and Their Mixture. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **30(10)**: 2335-2341.
- XIA, Y-Y., ZHAN, P., WANG, Y. (2008). Effects of Nonylphenol on Brain Gene Expression Profiles in F1 Generation Rats. *Biomedical and Environmental Sciences*, **21**: 1-6.
- XIA, H., WANG, A., ZHANG, Y., TIAN, H. (2013). Effects of Nonylphenol on immune function of female Sprague-Dawley rats. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **95(4)**: 658-668.
- XIAO, Q., LI, Y., OUYANG, H., XU, P., WU, D. (2006). High-performance liquid chromatographic analysis of bisphenol A and 4-nonylphenol in serum, liver and testis tissues after oral administration to rats and its application to toxicokinetic study. *Journal of Chromatography B.*, **830**: 322-329.
- XIE, X. Y., LU, W. J., CHEN, X. G. (2013). Binding of the endocrine disruptors 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenol to human serum albumin. *Journal of Hazardous Materials*, **248(249)**: 347-354.
- YAKOVLEV, A., KHAFIZOVA, M., ABDULLAEV, Z., LOUKINOV, D., KONDRATYEV, A. (2010). Epigenetic regulation of *caspase-3* gene expression in rat brain development. *Gene*, **450**: 103-108.
- YANG, X-S., LI J-S., ZHAO S-H. (2006). Effects of the environmental estrogen-bpa on the contents of *tnf- α* in blood serum of mice. *Modern Preventive Medicine*, **11**.
- YANG, J., SUN, M., ZHANG, A., LV, C., DE, W., WANG, Z. (2011). Adenovirus-mediated siRNA targeting *Bcl-xL* inhibits proliferation, reduces invasion and enhances radiosensitivity of human colorectal cancer cells. *World Journal of Surgical Oncology*, **9**:117.
- YAO, G., YANG, L., HUC, Y., LIANG, J., LIANG, J., HOUA, Y. (2006). Nonylphenol-induced thymocyte apoptosis involved *caspase-3* activation and mitochondrial depolarization. *Molecular Immunology*, **43**: 915-926.
- YAO, G., LING, L., LUAN, J., YE, D., ZHU, P. (2007). Nonylphenol induces apoptosis of Jurkat cells by a *caspase-8* dependent mechanism. *International Immunopharmacology*, **7**: 444-453.
- YEŞİLKAYA, E. (2008). Endokrin Bozucular. *Güncel Pediatri Dergisi*, **6**:76-82.

- YING, F., CHAO, D., RONG, D. G., WANG, X., LI, F., ZHANG, Y., ZENG, Q., YU, B., JI, E., HAN, X. (2012). Comparative evaluation of nonylphenol isomers on steroidogenesis of rat Leydig Cells. *Toxicology in Vitro*, **26**: 1114-1121.
- YILDIRIM A., BARDAKÇI F., KARATAŞ M. VE TANYOLAÇ B., (2007) Moleküler Biyoloji. Nobel Yayın No: 1170, Ankara.
- YOU, H. J., CHOI, C. Y., JEON, Y. J., CHUNG, Y. C., KANG, S. K., HAHM, K-S., JEONG, H. G. (2002). Suppression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression by 4-nonylphenol in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **294**:753-759.
- YUAN, J. S., REED, A., CHEN, F., STEWART, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data, *BMC Bioinformatics*, **7**:85
- ZHANG, Y. L., PANG, L-Q., XIAO-YAN, Y-W., WANG, W. C-Q., FAN, Y. (2008). Significance of *Bcl-xL* in human colon carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, **21;14(19)**: 3069-3073.
- ZHANG, C., EGANHOUSE, R. P., PONTOLILLO, J., COZZARELLI, I. M., WANG, Y. (2012). Determination of nonylphenol isomers in landfill leachate and municipal wastewater using steam distillation extraction coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1230**: 110-116.
- ZHANG, H., XUE, W., LI, Y., MA, Y., ZHU, Y., HUO, W., XU, B., XIA, W., XU, S. (2014). Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. *Toxicology Letters*, **225**: 325-332.

ÖZGEÇMİŞ

Fahriye ZEMHERİ, 1984 yılında Afyonkarahisar’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Afyonkarahisar’da tamamladım. Afyon Milli Piyango Anadolu Lisesi’nden 2002 yılında mezun oldum. Lisans eğitimimi 2008 yılında Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde tamamladım. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansımı 2011 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda doktora eğitimime başladım.