



Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü
Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalı
Biyoloji Eğitimi Bilim Dalı

**Dİ(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT'IN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI
(*Oncorhyncus mykiss*) PRİMER HEPATOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ
SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Gurbet CEYLAN KAPTANER

Yüksek Lisans Tezi

Van, 2019

Dİ(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT'IN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhyncus mykiss*) PRİMER HEPATOSİTLERİ ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gurbet CEYLAN KAPTANER

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Bedia BATI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü
Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalı
Biyoloji Eğitimi Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Bu Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafından FYL-2018-7523 No'lu Proje Olarak Desteklenmiştir.

Van, 2019

KABUL VE ONAY

Gurbet CEYLAN KAPTANER tarafından hazırlanan "Di(2-etilhekzil) fitalat'ın gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) primer hepatositleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması" başlıklı bu çalışma, 21.06.2019 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN (Başkan)



Dr. Öğr. Üyesi Bedia BATI (Danışman)



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet FİDAN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Fuat TANHAN

Enstitü Müdürü

BİLDİRİM

Hazırladığım tezin/raporun tamamen kendi çalışmam olduğunu ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi taahhüt eder, tezimin/raporumun kâğıt ve elektronik kopyalarının Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü arşivlerinde aşağıda belirttiğim koşullarda saklanmasına izin verdiğimi onaylarım:

- Tezimin/Raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.
- Tezim/Raporum sadece Yüzüncü Yıl Üniversitesi yerleşkesinden erişime açılabilir.
- Tezimin/Raporumun altı (6) ay süre ile erişime açılmasını istemiyorum. Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir.

21.06.2019



Gurbet CEYLAN KAPTANER

ADAMA

Biricik kızımız, canımız, İnci'ye...



TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőması yapılırken, destek ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Dr. Öğr. Üyesi Bedia BATI'ya ve saygıdeğer eşim Doç. Dr. Burak KAPTANER'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bu alıőma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: FYL-2018-7523). Tez çalıőmamıza verdiği maddi destekten dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de ayrıca teşekkür ederim.



ÖZET

CEYLAN KAPTANER, Gurbet. *Di(2-etilhekzil) fitalat'ın gökkuşığı alabalığı (Oncorhyncus mykiss) primer hepatositleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019.

Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), yaygın olarak kullanılan bir plastikleştiricidir. Bu çalışmada, primer kültürü yapılan gökkuşığı alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*) hepatositleri, DEHP (0, 25, 50, 100 ve 200 μ M)'ye 24 saat süre ile maruz bırakıldı ve sitotoksik etkiler, laktat dehidrogenaz salınımı ve antioksidan savunma sistemi biyomarkırları kullanılarak, araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, DEHP 50, 100 and 200 μ M konsantrasyonlarda önemli LDH salınımına sebep oldu. Süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi, DEHP'nin 25 μ M konsantrasyonunda anlamlı bir şekilde artarken, DEHP'nin 100 μ M konsantrasyonunda anlamlı bir şekilde azaldı. Katalaz (KAT) aktivitesi, DEHP'nin bütün konsantrasyonlarında artış gösterirken, KAT aktivitesinin DEHP'nin 100 μ M konsantrasyonunda, SOD ile eşzamanlı olarak, düştüğü gözlemlendi. Glutasyon peroksidaz aktivitesinin, DEHP'nin bütün konsantrasyonlarında arttığı belirlendi. İndirgenmiş glutasyon seviyesi, DEHP'nin 50 ve 200 μ M konsantrasyonlarında artış gösterdi. Glutasyon-S-transferaz aktivitesi, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarda değişmedi ancak 200 μ M konsantrasyona maruz bırakılan hepatositlerin GST aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu sonuçlar, DEHP sitotoksitesinin, hepatositlerdeki antioksidan yanıtlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Çalışma, DEHP ile uyarılan sitotoksitesinin mekanizmasına ışık tutacaktır.

Anahtar Sözcükler

Di(2-etilhekzil) fitalat, gökkuşığı alabalığı, *Oncorhyncus mykiss*, sitotoksite, antioksidan savunma.

ABSTRACT

CEYLAN KAPTANER, Gurbet. *Investigation of cytotoxic effects of di(2-ethylhexyl) phtalate on primary hepatocytes of rainbow trout (Oncorhyncus mykiss)*, Master Thesis, Van, 2019.

Di(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP) is a widely used plasticizer. In the present study, primary cultured hepatocytes of rainbow trout (*Oncorhyncus mykiss*) were exposed to DEHP (0, 25, 50, 100 and 200 μM) for 24 hours and cytotoxic effects were investigated using lactate dehydrogenase (LDH) release and antioxidant defense system biomarkers. According to the results, DEHP caused significant LDH release at concentrations of 50, 100 and 200 μM . Superoxide dismutase (SOD) activity increased significantly at 25 μM DEHP concentration whereas its activity was significantly decreased at 100 μM DEHP concentration. Activity of catalase (CAT) was significantly increased in all concentrations of DEHP while a simultaneous decrease in CAT activity with SOD activity was observed at 100 μM concentration of DEHP. Glutathione peroxidase activity was determined to be increased in all concentrations of DEHP. Levels of reduced glutathione elevated at 50 and 200 μM of DEHP concentrations. Glutathione-S-transferase (GST) activity remained unchanged at 25, 50 and 100 μM concentrations, whereas a significant increase in GST activity was observed at 200 μM treated hepatocytes. The results suggest that DEHP cytotoxicity is involved in antioxidant responses in hepatocytes. The study will offer insight into the mechanism of DEHP-induced cytotoxicity.

Key Words

Di(2-ethylhexyl) phtalate, rainbow trout, *Oncorhyncus mykiss*, cytotoxicity, antioxidant defense.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	i
BİLDİRİM	ii
ADAMA	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. BÖLÜM: GİRİŞ	1
2. BÖLÜM: KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Di(2-etilhekzil) Fitalat ve Canlılardaki Etkileri	3
2.2. Antioksidan Savunma	6
2.3. Di(2-etilhekzil) Fitalat'ın Balıklar Üzerindeki Etkileri	8
2.4. Di(2-etilhekzil) Fitalat'ın İn Vitro'da Farklı Hücre Tipleri Üzerindeki Etkileri	9
2.5. Deneysel Bir Model Olarak İzole Edilen Gökkuşığı Alabalığı Hepatositleri	11
3. BÖLÜM: MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Balık Temini	12
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	12
3.3. Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü	13
3.4. Hücre Kültürü Kimyasal Uygulama	15
3.5. Biyokimyasal Analizler	16
3.5.1. Laktat dehidrogenaz sitotoksisite testi.....	16
3.5.2. Homojenizasyon İşlemi.....	18
3.5.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini.....	18

3.5.4. Katalaz aktivitesi tayini.....	20
3.5.5. Glutasyon peroksidaz aktivitesi tayini.....	22
3.5.6. Glutasyon-S-transferaz aktivitesi tayini.....	23
3.5.7. Redükte glutasyon tayini.....	25
3.5.8. Total protein tayini.....	26
3.6. İstatistiksel Analizler.....	27
4. BÖLÜM: BULGULAR.....	28
5. BÖLÜM: TARTIŞMA VE SONUÇ.....	33
KAYNAKÇA.....	38
Ek 1. Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu.....	43



SİMGELER DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur:

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
ΔA	Absorbans değişimi
$^{\circ}C$	Santigrat derece
μL	Mikrolitre
A	Absorbans
atm	Atmosfer
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
<i>g</i>	Gravite
HO•	Hidroksil radikali
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
m^3	Metreküp
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mmol	Milimol
n	Örnek sayısı
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit radikali

ort	Ortalama
P	İstatistiksel önem derecesi
ROOH	R Peroksid
ss	Standart sapma
sn	Saniye
U	Ünite
W	Watt
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar



KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılan kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur:

Kısaltmalar	Açıklama
<i>17βhsd</i>	17beta hidroksi steroid dehidrogenaz
ANOVA	Varyans analizi
BSA	Sığır serum albumin
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
<i>cyp17a1</i>	Sitokrom P450 17-hidroksilaz 1
<i>cyp19a</i>	Sitokrom P450 19a
<i>cyp19b</i>	Sitokrom P450 19b
<i>cyp1A</i>	Sitokrom p450 1A
DEHP	Di(2-etilhekzil) fitalat
DTD	DT-diaforaz
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EC20	Yüzde 20 etkili konsantrasyon
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGTA	Etilen glikol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraasedik asit
ER	Östrojen reseptörü
<i>fshβ</i>	Folikül stimüle edici hormon beta
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GCS	γ-glutamilsistein sentetaz
<i>gnrhr2</i>	Gonadotropin saliverici hormon reseptörü 2
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GS	Glutasyon sentetaz
GSH	Redükte glutasyon
GSSG	Okside glutasyon

GST	Glutasyon-S-transferaz
HSD	Honestly significant difference (dürüstçe anlamlı fark)
IgM	İmmunoglobulin M
INT	2-(iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür
KAT	Katalaz
L-15	Leibovitz 15
LD50	Medyan letal doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
<i>ldlr</i>	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
LOEC	Etkisi gözlenen en düşük konsantrasyon
MEHP	Mono(2-etilhekzil) fitalat
NADP+	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
NOEC	Etkisi gözlenmeyen konsantrasyon
Nrf-2	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
OECD	Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PBS	Fosfat tuz tamponu
PVC	Polivinil klorür
ROS	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dizmutaz
<i>star</i>	Steroidojenik akut regülör protein
WST	Suda çözünür tetrazolyum

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. DEHP'nin fizikokimyasal özellikleri.....	4
Tablo 2. DEHP'nin canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri (Zolfaghari ve ark., 2014).....	6
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	12
Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi.....	13
Tablo 5. LDH sitotoksosite ölçüm kiti içeriği.....	16
Tablo 6. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları.....	19
Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları.....	20
Tablo 8. KAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nin hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar.....	21
Tablo 9. KAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları.....	21
Tablo 10. KAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları.....	21
Tablo 11. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları.....	23

Tablo 12. GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları.....23

Tablo 13. GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları.....24



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** DEHP'nin insan, hayvanlar ve bitkilerdeki potansiyel toksik etkileri (Magdouli ve ark., 2013).....5
- Şekil 2.** Oksidatif stresin şematik diyagramı. Antioksidan enzimler mavi kutularda, diğerleri gri kutularda gösterilmiştir. Okside moleküller kırmızı ile belirtilmiştir. (cyp1A: sitokrom p450 1A; DTD: DT-diaforaz; GCS: γ -glutamilsistein sentetaz; G6PDH: glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; GPx: glutatyon peroksidaz; GR: glutatyon redüktaz; GS glutatyon sentetaz; GSH: redükte glutatyon; GSSG: okside glutatyon; GST: glutatyon-S-transferaz; KAT: katalaz; Q: redoks çevirimindeki bileşik; NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte); NADP+: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside), SOD: süperoksit dizmutaz) (Almroth, 2008)7
- Şekil 3.** Gökkuşluğu alabalığından izole edilen hepatositlerin ekildikten 24 saat sonraki görüntüsü.....15
- Şekil 4.** LDH-sitotoksisite ölçüm kiti çalışma prensibi. (<https://www.dojindo.eu.com/store/p/851-Cytotoxicity-LDH-Assay-Kit-WST.aspx>).....17
- Şekil 5.** GSH standart eğrisi.....25
- Şekil 6.** Protein standart eğrisi.....27

- Şekil 7.** DEHP'nin 200 µM konsantrasyonuna maruz bırakılan hepatositlerde kuyu tabanındaki kalkmalar.....15
- Şekil 8.** DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositleri üzerindeki sitotoksitesisi. Sitotoksitesite kültür medyumuna salınan LDH'a dayanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar ort ± ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....28
- Şekil 9.** DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, SOD aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort ± ss sapma olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....30
- Şekil 10.** DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 µM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, KAT aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort ± ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....30

Şekil 11. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşığı alabalığı hepatositlerinde, GPx aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....31

Şekil 12. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşığı alabalığı hepatositlerinde, GST aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....32

Şekil 13. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşığı alabalığı hepatositlerindeki, GSH seviyesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).....32

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Pestisitler, alkil fenoller, poliaromatik hidrokarbonlar, alkoller, ağır metaller, deterjanlar ve plastikleştiriciler gibi endüstriyel, evsel ve zirai kaynaklı kimyasal maddeler, karasal ve sucul ortamlarda yaşayan canlılarda organ hasarı, üreme ve gelişim bozuklukları ve yaşam faaliyetlerinin engellenmesi gibi olumsuzlukları, meydana getirme potansiyeline sahiptirler. Bu kimyasalların ve bunların parçalanma ürünlerinin, mutajenik, toksik veya endokrin sistemi bozucu etkileri birçok bilimsel çalışmada gösterilmiştir. Bunların büyük çoğunluğu da canlı bünyesine farklı yollar ile nüfuz ederek dokularda birikime neden olmaktadır.

Gündelik hayatta kullandığımız ürünlerde ve gerçekleştirdiğimiz uygulamalarda yer alan ve insan başta olmak üzere diğer canlıların da sağlığı için risk oluşturan kimyasalların başında, fitalatlar gelmektedir. Plastikleştirici olarak kullanılan bu kimyasal grubu, geniş çapta üretimlerinden ve geniş bir ürün yelpazesinin üretiminde yer almalarından dolayı, çevreye kolaylıkla karışabilmekte ve canlılara zarar verebilmektedirler. Fitalatlar, esnek materyaller, gıda paketleri, inşaat sektöründe kullanılan malzemeler, oyuncaklar, kozmetikler, tıpta kullanılan intravenöz sıvı torbaları ve kan saklama torbaları gibi malzemelerin üretiminde yer almaktadır. Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), fitalatlar içerisinde en yaygın olarak tercih edilenlerdendir. Çevre ve insan sağlığı üzerine toksik etkileri nedeni ile DEHP, B2 sınıf bileşik (muhtemel bir insan karsinojeni) olarak sınıflandırılmış ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı'na göre en öncelikli çevre kirleticisi olarak listelenmiştir. Avrupa Birliği DEHP'nin çocuk ürünlerinde kullanımını yasaklamıştır. Bahsi edilen nedenlerden dolayı DEHP'nin toksik etkilerinin ortaya çıkartılarak öğrenilmesi ve DEHP'nin risklerine karşı gereken önlemlerin alınması elzemdir.

Atık sular ile çevreye karışan DEHP, birçok ülkenin yüzey sularında tespit edilmiştir. Sucul organizmaların başında yer alan balıklar da DEHP'ye maruz kalabilmekte ve DEHP'den olumsuz olarak etkilenebilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalar, DEHP'nin balıklarda büyüme, gelişme ve üremeyi olumsuz

etkilediğini göstermiştir. DEHP'nin balıklarda meydana getirdiği en önemli olumsuzluklar arasında, hormon seviyelerini değiştirmesi, hepatik vitellogenin seviyesini yükseltmesi, östrojen reseptörü gen ekspresyon seviyelerinde değişimler meydana getirmesi ve gonad histopatolojisine neden olması gibi endokrin bozucu etkiler sayılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise DEHP'nin balık karaciğerinde antioksidan savunmayı etkilediği belirlenmiştir.

Balıklardan izole edilen hücreler toksikoloji ve ekotoksikoloji çalışmalarında, birçok kimyasal maddenin toksik etkilerinin ortaya çıkartılmasına ve bu maddelerin balıklardaki olumsuz etkilerinin öğrenilmesine olanak sağlar. Gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*), tüketimi oldukça yaygın olan ve Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından test organizması olarak önerilen bir balık türüdür. Karaciğerin toksik maddelerin elimine edildiği temel organ olması nedeni ile bu çalışmada karaciğerden izole edilen ve kültürü yapılan hepatositler tercih edilmiştir. Bu çalışmada DEHP'nin, gökkuşığı alabalığının primer hepatositleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır

Bu çalışmada DEHP'nin gökkuşığı alabalığı hepatositlerindeki toksik mekanizmasının aydınlatılması ve elde edilen bulgular ile bilimsel literatüre katkı sağlanması amaçlandı. Bu amaçlar doğrultusunda; 1) gökkuşığı alabalığı primer hepatosit kültürüne, DEHP'nin 4 farklı konsantrasyonu uygulanarak, laktat dehidrogenaz sitotoksisite testi ile DEHP'nin sitotoksik etkisi belirlendi, 2) DEHP'nin hepatositlerdeki enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi belirteçleri (süperoksit dizmutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz ve glutatyon içeriği) üzerindeki etkileri araştırıldı.

2. BÖLÜM

KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Di(2-etilhekzil) Fitalat ve Canlılardaki Etkileri

Dünya çapında artan kentleşme ve endüstrileşme, bazı kompleks ve toksik organik bileşiklerin, çevreye salınması ile sonuçlanmıştır. “Yeni ortaya çıkan kirleticiler” olarak nitelenen kirleticiler, birçok ülkede tespit edilmiştir. Çevre ve insan sağlığı için olumsuz önemli etkilere yol açan yeni ortaya çıkan kirleticiler arasında yer alan fitalatlar, geniş çapta üretiminden, kullanımından ve endokrin bozucu davranışından dolayı, bu kirleticiler arasında en başta gelenlerden biri olarak düşünülür. Çevrede yaygın olarak bulunan fitalatlar, kimyasal olarak stabil, kokusuz, renkli ve tatsız sıvılardır. Polimer matrislere kimyasal olarak bağlı olamadıklarından dolayı, üretimleri, kullanımları veya uzaklaştırılmaları sırasında çevreye kolaylıkla sızılmaktadırlar (Magdouli ve ark., 2013; Zolfaghari ve ark., 2014).

Dietil fitalat, di (2-etilhekzil) fitalat, benzilbütül fitalat, mono-bütül fitalat, di-n-bütül fitalat, di-izononil fitalat ve di-izodesil fitalat kimyasal endüstrisinde kullanılan en yaygın plastikleştiricilerdir (Staples, 1997). Bu plastikleştiricileri içeren esnek materyaller, gıda paketlerinde, inşaat sektöründe, oyuncaklarda, intravenöz sıvı torbaları, kan saklama torbaları gibi tıbbi araçlarda kullanılırlar (Magdouli ve ark., 2013; Zolfaghari ve ark., 2014).

Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), onaylanmış farmasötik formülasyonlarda yardımcı madde olarak kullanılır, polivinil klorür (PVC)'e esnekliğini artırmak amacı ile katılır ve boyalarda ise bir solvent olarak kullanılır. DEHP'nin düşük buhar basıncı ($25\text{ }^{\circ}\text{C'de } 7.23 \times 10^{-8}\text{ mm Hg}$), işlem süreci sırasında zayıf buharlaşma yeteneği sağlar. Sudaki düşük çözünürlüğü (0.285 mg/L) ve yüksek oktanol-su kısmi katsayısı ($\log K_{ow} = 7.6$) asılı materyallere tutunmasını ve hidrofobik karakterini belirler (DEHP'ye ait fiziko-kimyasal özellikler Tablo 1'de belirtilmiştir). Genel olarak DEHP'nin çevreye taşınan ve insan vücuduna su, hava, gıda ve tıbbi ekipmanlar ile nüfuz eden ve yüksek miktarda satışı yapılan bir plastikleştirici olduğu, düşünülmektedir. Kaliforniya ve Kanada, toksik etkilerinden dolayı, DEHP kullanımına sınırlandırma getirirken, Avrupa Birliği

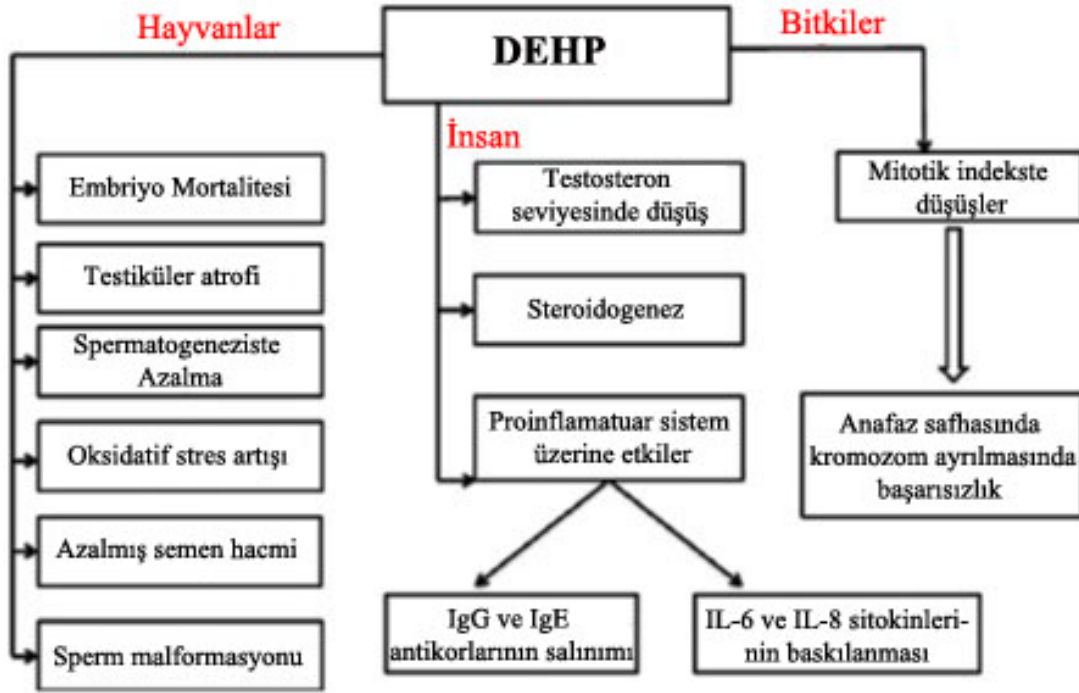
DEHP'nin çocuk ürünlerinde kullanımını yasaklamıştır. Çevre ve insan sağlığı üzerine olan baskın toksik etkileri nedeni ile DEHP, B2 sınıf bileşik (muhtemel bir insan karsinojeni) olarak sınıflandırılmış ve Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı'na göre en öncelikli çevre kirleticisi olarak listelenmiştir. Toksik Maddeler ve Hastalık Tescil Ajansı DEHP'yi yeni ortaya çıkan bir endokrin bozucu ve epigenetik toksik madde olarak sınıflandırmıştır (Magdouli ve ark., 2013).

Tablo 1. DEHP'nin fizikokimyasal özellikleri

Formül	Moleküler Ağırlık	Sudaki Çözünürlüğü (25 °C'de mg/L)	log K_{ow}	Kaynama Noktası (°C)	Buhar Basıncı (25 °C'de mm Hg)	Henry Yasası Sabiti (25 °C'de atm m ³ /mol)
C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.6	0.285	7.6	385	7.23 × 10 ⁻⁸	4.37 × 10 ⁻⁵

DEHP, birçok yüzey suyunda (0.013 – 18.5 µg/L), atık sularda (0.716 – 122 µg/L), kirletici atık su sızıntısında (88 – 460 µg/L), lağım çamurunda (12– 1250 mg/kg), toprakta (2– 10 mg/kg) tespit edilmiştir. Bu kirletici çevrede kalıcıdır ve yıkılması sonucunda meydana gelen yan ürünlerin toksik etkisi bazen, ana bileşiğin toksik etkisini alevlendirmektedir (Zolfaghari ve ark., 2014).

DEHP'nin potansiyel toksisitesi hakkında elde edilen bilgilerin yeterli olmaması ile birlikte, insan, hayvanlar ve bitkilerde rapor edilmiş birçok toksik etkisi mevcuttur (Şekil 1). Bir endokrin bozucu olarak tanımlanan DEHP, ratlarda Leydig hücre hiperplazisi meydana getirerek ve sistemik fizyolojiyi etkileyerek, üreme hormonlarının düzenlenmesini değiştiren bir endokrin bozucu olarak tanımlanmıştır. İnsan yapımı DEHP, 2-etilhekzanol'ün fitalik anhidrit ile reaksiyonu sonucunda üretilir. DEHP intestinal lipazlar aracılığı ile sonradan emilimi öncelikli olarak tercih edilen mono-(2-etilhekzil) fitalat (MEHP)'a dönüştürülür. MEHP insanların DEHP maruziyetinin izlenmesinde bir biyomarkır olarak kullanılır. DEHP sindirim esnasında, karaciğer ve kandaki esterazlar ile hızlı bir şekilde etkileşip MEHP'ye dönüştürülür. MEHP daha sonra mono-(2-etil-5-hidroksihekzil) fitalata ve mono-(2-etil-5-oksohekzil) fitalata metabolize edilir. Esasen DEHP'nin metabolizması, serbest monoesterler ve glukorinik asit konjugatları olarak idrarla dışarı atılma şeklindedir (Magdouli ve ark., 2013).



Şekil 1. DEHP'nin insan, hayvanlar ve bitkilerdeki potansiyel toksik etkileri (Magdouli ve ark., 2013).

Geçmişte yapılan birçok çalışmada DEHP'nin insan ve diğer canlılarda toksik etkiler oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 2). DEHP'nin insanda meydana getirdiği toksik etkiler, uzun süreli ve düşük konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Birleşik Devletler İnsan ve Sağlık Hizmetleri Departmanı, DEHP'nin 1.4×10^{-2} mg/kg/gün konsantrasyonunda kanser riski oluşturabileceğini rapor etmiştir. Aynı şekilde, 0.77 µg/L konsantrasyon civarında sperm anormalliklerine sebep olduğu bildirilmiştir. DEHP'nin musluk suyundaki miktarının bile tiroid hormonları üzerine potansiyel toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. DEHP'nin insan çekirdek reseptörü, steroid ve zenobiyotik reseptörü ile etkileşebildiği ve çoklu ilaç direnç gen ifadesini aktive ettiği insan hücre hattında gösterilmiştir. 2-etilhekzanol, 2-etilhekzanal ve 2-etilhazsanoik asit gibi DEHP yan ürünlerinin DEHP'den daha toksik olduğu bulunmuştur. MEHP'nin proinflamatuvar sistemi etkilediği, apoptoza ve DNA hasarına neden olduğu belirlenmiştir. Bunlardan başka MEHP'ye maruziyetin DNA iplik kırıkları ve yarıkları gibi kromozom aberasyonlarını uyarabildiği gösterilmiştir. DEHP çevre ve insan sağlığı üzerine toksik etkiye

sahiptir ve insanlar DEHP'ye başlıca içme suyu, gıdalar ve ambalajlardan ağız yolu ile maruz kalmaktadırlar (Zolfaghari ve ark., 2014).

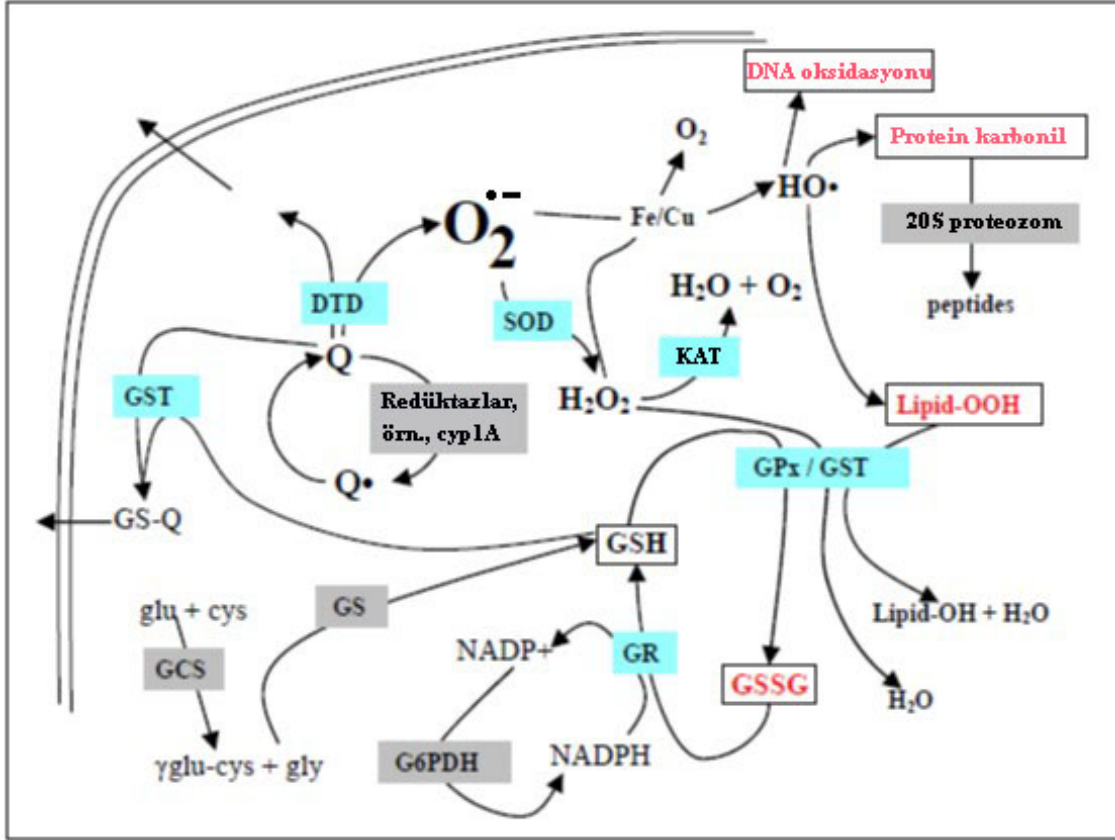
Tablo 2. DEHP'nin canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri (Zolfaghari ve ark., 2014).

Tür	Doz ve maruziyet zamanı	Olumsuz etkiler
Erişkin İnsan	1.4×10^{-2} mg/kg/gün, nefes yolu ile uzun süreli maruziyet	Kanser, sperm DNA fragmentasyonu ve sperm motilitesinde azalma
	0.77 µg/L	Sperm anormallikleri
	3.9 µg/L	Östrojen reseptör ifadesini yükseltme
	12.89 mg/kg	Tiroid reseptör antagonisti potansiyeli (EC20)
Sığan	30600 mg/kg	Mortalite dozu (LD50)
	0.9/1.9 g/kg	Tübüler atrofi üzerine olumsuz etkiler
	10 gün süresince günde 6 saat 0.3 mg/L'ye kadar soluma	Ağırlık kaybı
	1440 mg/kg/gün konsantrasyonuna kadar 6 hafta maruziyet	Dalak, karaciğer, pankreas, adrenal bez ve böbrek üzerine toksik etki
Fare	Diyette % 1-2 oranında kısa ve uzun süreli (2, 6, 17 hafta) maruziyet	Karaciğer büyümesi, spermatogeneziste durma
	500 mg/kg/gün	Gebelik kaybı
Lepistes	0.1 – 10 µg/L konsantrasyon aralığında, kısa süreli maruziyet (91 gün)	Vücut uzunluğu ve ağırlığında %10-40 oranında azalma
Atlantik salmonu	NOEC (LOEC) = 300 (1500) mg/kg yem miktarına 4 hafta maruziyet	Cinsiyet oranı, karaciğer ve somatik indeks üzerine olumsuz etkiler

2.2. Antioksidan Savunma

Aerobik organizmalarda oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki kritik dengenin bozulmasından, antioksidan eksikliği veya aşırı reaktif oksijen türleri (ROS)'nin birikmesinden ya da her ikisinin meydana gelmesinden dolayı ortaya çıkar. Bu durumda da hücrel hasar meydana gelir. Birçok zenobiyotik, sucul organizmalarda ROS oluşumuna yol açabilir ve antioksidan veya serbest oksijen radikalleri ile mücadele eden enzim sistemlerinde değişikliğe neden olabilir. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve yüksek derecede reaktif olan hidroksil radikali (HO^{\bullet}) gibi ROS'lar, hassas biyolojik makromoleküller ile etkileşebilir ve lipid peroksidasyonu, DNA

hasarı ve protein oksidasyonu oluşturabilir. Sonuç olarak hücrel oksidatif stres meydana gelir (Şekil 2). ROS'ların potansiyel tehlikesine rağmen, hücreler serbest radikallerin



Şekil 2. Oksidatif stresin şematik diyagramı. Antioksidan enzimler mavi kutularda, diğerleri gri kutularda gösterilmiştir. Okside moleküller kırmızı ile belirtilmiştir. (cyp1A: sitokrom p450 1A; DTD: DT-diaforaz; GCS: γ -glutamilsistein sentetaz; G6PDH: glukoz-6-fosfat dehidrogenaz; GPx: glutasyon peroksidaz; GR: glutasyon redüktaz; GS glutasyon sentetaz; GSH: redükte glutasyon; GSSG: okside glutasyon; GST: glutasyon-S-transferaz; KAT: katalaz; Q: redoks çevirimindeki bileşik; NADPH: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (indirgenmiş); NADP+: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside), SOD: süperoksit dizmutaz) (Almroth, 2008).

zararlı etkilerini nötralize edebilmek için, farklı savunma sistemlerine sahiptirler. Serbest radikallerin olumsuz etkilerinin uzaklaştırılması enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar (GSH, askorbat (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), vitamin A) aracılığıyla gerçekleştirilir. Antioksidan savunma sistemi, süperoksit dizmutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT), glutasyon S-transferaz (GST) gibi enzimleri ve glutasyon (GSH) gibi düşük molekül ağırlıklı

diğer süpürücüleri kapsar (Şekil 2). SOD (sitozolik: Cu-, Zn-SOD ve mitokondriyal: Zn-SOD) süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$)'nu daha az reaktif bir tür olan moleküler oksijene ve hidrojen peroksitine metabolize eder. Hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksizomal ve mitokondriyal KAT ile su ve moleküler oksijene ayrıştırılır. H_2O_2 ve organik hidrojen peroksitler, sitozolik ve mitokondriyal GPx tarafından, tripeptid GSH varlığında, ortadan kaldırılabilmektedirler. Bu bileşik aynı zamanda, GST ile reaksiyona giren, elektrofilik bileşenlerin ortadan kaldırılmasına da katılır (Şekil 2). GST, hem reaktif ara moleküllerin hem de oksijen radikallerinin detoksifikasyonu ile ilişkili çeşitli elektrofilik metabolitleri GSH ile katalizleyen, çok fonksiyonel enzimlerin bir grubudur. GST zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynar bununla birlikte toksik etkilere yol açan yüksek oranda reaktif elektrofilik bileşiklerin, dokudaki nukleofilik bileşenlere bağlanması öncesinde bunların eliminasyonuna da katkı sağlar (van der Oost ve ark., 2003; Monterio ve ark., 2006).

Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar balık hücrelerinin redoks dengesinin devamlılığı için gereklidir ve oksidatif strese karşı önemli bir biyolojik savunma sistemi olarak fonksiyon görürler. Antioksidan enzim aktiviteleri, glutatyon redoks durumu, lipid peroksidasyonu üretimindeki düzey ve spesifik GST uyarımı, balıklarda toksikolojik değerlendirmeler için sıklıkla kullanılan biyomarkırlardır (van der Oost ve ark., 2003; Oruç ve Usta 2007).

2.3. Di(2-etilhekzil) Fitalat'ın Balıklar Üzerindeki Etkileri

DEHP'ye intraperitoneal enjeksiyon (10 mg/kg) yapılarak on gün süre ile maruz bırakılan havuz balığı (*Carasius auratus*)'nın karaciğerinde, KAT aktivitesinin azaldığı, SOD ve GPx aktivitelerinin değişmediği, tespit edilmiştir (Zheng ve ark., 2013).

Ye ve ark. (2014), DEHP ve MEHP'nin deniz medaka (*Oryzias melastigma*)'sında üreme fonksiyonu üzerine etkisini araştırmışlardır. DEHP'nin yumurta açılımından ergin döneme kadar 6 aylık bir maruziyet sonrasında yumurtlamayı hızlandırdığı ve yumurta üretimini düşürdüğü bildirilmiştir ancak bu etkinin MEHP'ye maruz bırakılan dişi bireylerde gözlenmediği rapor edilmiştir. DEHP ve MEHP'ye maruz bırakılmamış dişi bireyler, bu iki kimyasal ile muamele

edilen erkek bireyler ile çiftleştirildiklerinde, bırakılan yumurtaların dölleme oranında düşüşün olduğu tespit edilmiştir. Erkek bireylerde 17β -östradiol seviyesinin önemli bir şekilde yükselmesi ile birlikte, plazma testosteron/ 17β -östradiol oranında düşüşün gözlemlendiği, aynı zamanda testiste *ldlr*, *star*, *cyp17a1*, *17 β hsd* ve *cyp19a* transkripsiyonunun arttığı bildirilmiştir. Dişilerde *ldlr* artışı ile birlikte yüksek testosteron ve 17β -östradiol seviyesinin meydana geldiği tespit edilmiştir. Beyin *gnrhr2*, *fsh β* , *cyp19b* ve steroid reseptör genlerinin ifadesinin hormonal ve üreme ile ilgili değişimler ile uyumlu olduğu ifade edilmiştir. DEHP ve MEHP'nin erkek bireylerin karaciğerinde vitellogenin seviyesini artırdığı ve testis/ovaryum dokularında histolojik değişimleri meydana getirdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu iki kimyasalın deniz medaka (*Oryzias melastigma*)'sında, yumurta açılımından ergin döneme kadar endokrin bozucu etkiler gösterdiğini, bu etkilerin cinsiyete bağımlı etkiler olduğunu ve erkek bireylerin dişilere göre daha hassas olduklarını rapor etmişlerdir.

DEHP'nin 0.05, 0.1, 1, 10 ve 100 nM ve DEHP metaboliti fitalik asidin 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarına maruz bırakılan zebra balığı (*Danio rerio*) primer hepatosit kültüründe vitellogenin seviyesinin, hem dişi hem de erkeklerden elde edilen hepatositlerde uyarıldığı ve DEHP'nin östrojen benzeri etki gösterdiği belirlenmiştir. Primer hepatositlerdeki östrojen reseptör izoformlarının ($ER\alpha$, $ER\beta$, $ER\gamma$) ise maruziyet sonrasında, cinsiyete bağımlı olarak farklı düzenlenme gösterdiği rapor edilmiştir (Maradonna ve ark., 2013).

DEHP, dietil fitalat, dibütil fitalat ve benzil bütil fitalatın koca golyan balığı (*Pimephales promelas*) embriyolarındaki biyolojik etkilerini inceleyen Mankidy ve ark. (2013), incelenen bütün fitalat tiplerinin aril hidrokarbon reseptörüne zayıf agonistik etki gösterdiğini, DEHP ve dietil fitalatın medyumdaki 17β -östradiol seviyesini artırarak endokrin bozucu potansiyele sahip olduğunu, fitalatlara maruziyetin sitotoksik ve oksidatif etkilere yol açtığını bildirmişlerdir.

2.4. Di(2-etilhekzil) Fitalat'ın İn Vitro'da Farklı Hücre Tipleri Üzerindeki Etkileri

Son yıllarda DEHP'nin farklı hücre hatlarında meydana getirdiği sitotoksik etkiler, in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir. DEHP'nin rat insülinoma, INS-1,

hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerini araştıran Sun ve ark. (2015), bu hücreleri DEHP'nin 0, 5, 25, 125 ve 625 μM konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakarak hücre canlılığı, reaktif oksijen türü (ROS) oluşumu, hücresel antioksidan yanıt, Ca^{2+} homeostazisi, endoplazmik retikulum stresi ile ilişkili gen ve proteinlerin seviyelerini ölçmüşlerdir. Araştırmacılar DEHP'nin INS-1 hücrelerinde insülin salınımını azalttığını ve doza bağımlı bir şekilde apoptozisi artırdığını belirlemişlerdir. DEHP'ye maruziyet sonrasında INS-1 hücrelerinde ROS oluşumunun yükseldiği, Nrf-2 bağımlı antioksidan savunmanın bozulduğu dolayısıyla oksidatif stresin uyarıldığı ifade edilmiştir. Öte yandan, DEHP'nin bu hücrelerde endoplazmik retikulum Ca^{2+} seviyesini tükettiği ve endoplazmik retikulum stresini harekete geçirdiği bildirilmiştir.

Ma ve ark. (2018), DEHP'nin 0, 0.125, 0,5 ve 2 mmol/L konsantrasyonlarına 48 saat süre ile maruz bıraktıkları insan bronşiyal epiteli 16HBE hücrelerinde, hücre proliferasyonunu, hücre döngüsünü, apoptozisi, global DNA metilasyonunu ve DNA metil transferazların ekspresyon seviyelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar DEHP'nin 2 mmol/L konsantrasyonda hücre canlılığını azalttığını, hücre döngüsünü G1 fazında inhibe ettiğini ve apoptozisi uyardığını belirlemişlerdir. Bu etkilere ilave olarak DEHP'nin global DNA metilasyon ve DNA metil transferazların ekspresyon seviyelerinde azalmalara neden olduğu, bu nedenle de muhtemel bir epigenetik etki gösterebildiği ifade edilmiştir.

DEHP'nin farklı konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 200 ve 400 μM) 24 saat süre ile maruz bırakılan GC-2spd hücrelerinde (mayoz öncesi fare spermatozoidleri) apoptozisi ve apoptoziste testis orfan nükleer reseptör 4 (TR4)/Bcl-2 yolunun rolünü araştıran Zhu ve ark. (2016), DEHP'nin hücre canlılığını dereceli olarak azalttığını ve 100 μM konsantrasyonun üzerinde apoptotik hücre ölümünü artırdığını bildirmişlerdir. DEHP'nin 200 μM konsantrasyonda ise SOD ve GPx aktivitelerini azaldığı tespit edilmiştir. DEHP'ye maruziyet sonrasında, kaspaz-3 mRNA seviyelerinin önemli bir şekilde yükseldiği, öte yandan Bcl-2 mRNA seviyesinin azaldığı ifade edilmiştir. TR4, Bcl-2 ve prokaspaz-3 protein seviyelerinin ise önemli bir şekilde düştüğü gözlenmiştir.

Araştırıcılar DEHP'nin GC-2spd hücrelerinde apoptozisin uyarımını, TR4/Bcl-2 yolu aracılığı ile uyarabileceğini belirtmişlerdir.

DEHP'ye maruz bırakılan (0, 4, 16, 64 ve 256 µM; 2 ile 7 gün) gökkuşağı alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*)'nin kùltürü yapılan immun dokularında IgM salgılayan hücre miktarının azaldığı ve B hücre proliferasyonunun inhibe olduğu bildirilmiştir (Martins ve ark., 2015).

2.5. Deneysel Bir Model Olarak İzole Edilen Gökkuşağı Alabalığı Hepatositleri

Balık hepatositlerinin, ekofizyolojik ve ekotoksikolojik çalışmalarda deneysel bir model olarak kullanımı, zamana ve doza bağlı uyarım süreçlerinin izlenmesi için oldukça caziptir (Segner, 1998). Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*) dünyada ve ÷lkemizde tüketimi oldukça yaygın olan bir balık türüdür. Bu tür aynı zamanda Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından toksikoloji çalışmalarında kullanılması tavsiye edilen bir test organizmasıdır (OECD, 1992). Gökkuşağı alabalığından izole edilen primer hepatositler ise tek bir kimyasal ve kimyasal karışımlarının etkilerinin ortaya konulması için iyi bir şekilde karakterize edilmiş olan ve toksikoloji çalışmalarında tercih edilen tarama araçlarından birisidir (Tollefsen ve ark., 2008).

3. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Balık Temini

Çalışmada toplam 4 adet, gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) (total ağırlık: 180 – 210 g) kullanıldı. Balıklar yerel bir alabalık çiftliğinden (Şifa Alabalık, Gürpınar, Van) temin edildi. Çalışma sırasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde yer alan etik ilkelere riayet edildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar sırasıyla, Tablo 3 ve Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Model
Buzdolabı	Beko	BK 9330 NF
Derin dondurucu	Beko	BK 7971 DF
Hassas terazi	Sartorius	ED 224S
İnkübatör	BINDER	KB 115
İnvert mikroskop	Leica	DMI 6100 B
Manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR 3001
Mikroplaka okuyucu	DAS	A3
Mikroskop	Leica	DM500
pH metre	Sartorius	PB-11
Soğutmalı Santrifüj	Sigma	1-15 K
Spektrofotometre	Shimadzu	UV/VIS 1201
Spektrofotometre	A&E LAB	UV/VIS AE-S90-ID
Steril laminar akış kabini	ESCO	AC2-4E1
Sterilizatör	Sanyo	MOV-212S
Su banyosu	-	-
Ultrasonik homojenizatör	Jencons	LU7 8UA
Vorteks	Heidolph	Reax Top QO4

Tablo 4. Çalışmada kullanılan kimyasalların listesi

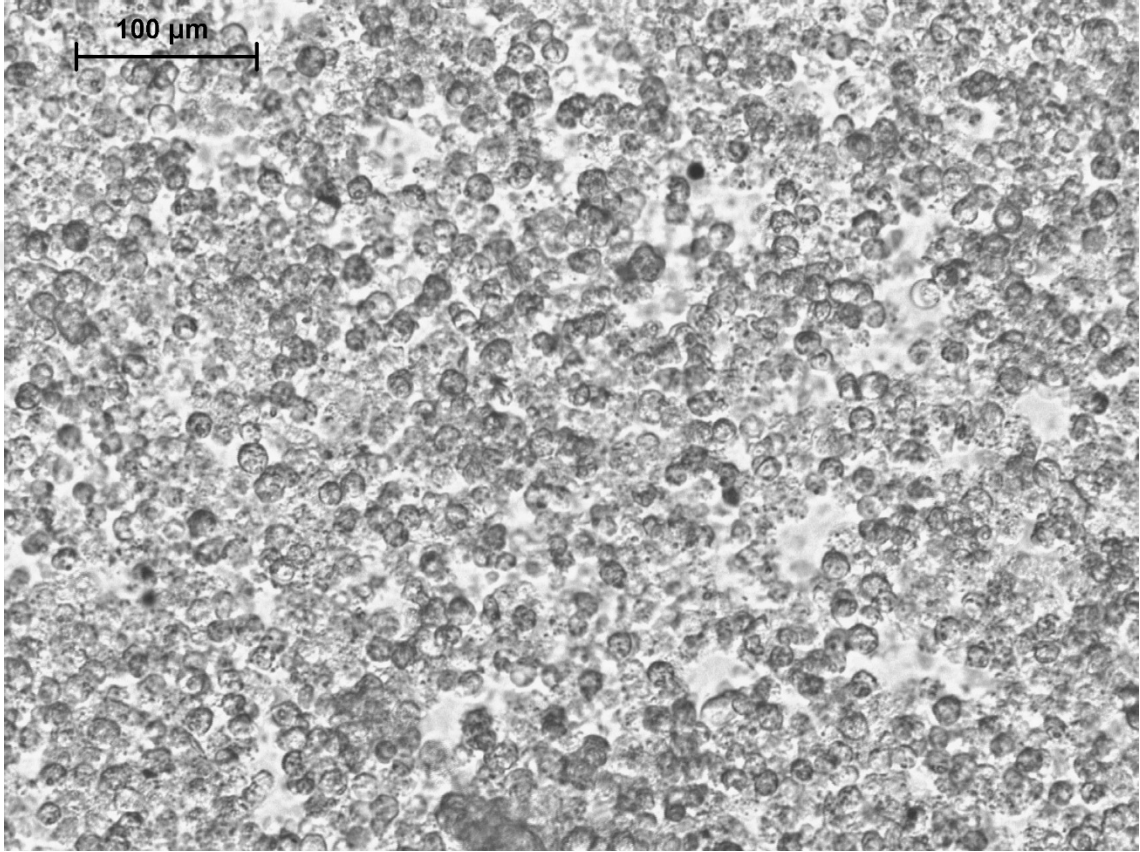
Kimyasal/Sarf	Marka	Katalog numarası
2-Fenoksietanol	Fluka	77699
Antibiyotik- antimikotik solüsyon	Sigma	A5955
Bis(2-etilhekzil) fitalat, Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP)	Sigma-Aldrich Pestanal®	36735
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	1.02382
CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen)	Fluka	24440
Coomasie Brilliant G	Applichem	A3480
DTNB (5,5'-ditiyobis-2nitrobenzoik asit)	Sigma	D8130
EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)	Sigma	E6758
EGTA (Etilen glikol tetra-asedik asit)	Fluka	O3777
Etanol (% 99.9)	Merck	1.00983
Fosfat tuz tampon (PBS)	Sigma	P4417
Glutasyon peroksidaz kiti	Randox-Ransel	RS505
GSH (Redükte Glutasyon)	Sigma-Aldrich	G4251
H ₂ O ₂	Merck	1.08597
KCl	Merck	1.04936
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873
Kollajenaz	Sigma-Aldrich	C5138
L-15 (Leibovitz 15)	Sigma	L1518
Laktat dehidrogenaz sitotoksisite ölçüm kiti	Abcam	ab65393
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	1.05886
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	71640
NaCl	Merck	1.06404
NaH ₂ PO ₄	Fluka	71496
NaHCO ₃	Merck	1.06329
Sığır serum albumin	Fluka	05471
Süperoksit dismutaz kiti	Randox-Ransod	SD125
Sodyum sitrat tribazik dihidrat	Sigma	S4641
Tripan mavisi	Sigma	T8154

3.3. Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü

Hepatosit izolasyonu, Tollefsen ve ark., (2008) ve Mortensen ve ark., (2006)'ndan bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Hepatosit izolasyonu

öncesinde, bütün cam malzemeler ve cerrahi aletler kuru hava sterilizatöründe, 120 °C'de ve 2 saat süre ile steril edildi. Çalışmada kullanılacak olan solüsyonlar ve medyum ise 0.20 µm por açıklığına sahip olan şırınga filtresinden (Minisart, Sartorius, Almanya) geçirilerek steril edildi. Balıklardan (n = 4) karaciğer çıkartılmadan önce buldukları suya, 2-fenoksietanol eklenerek (320 µL/L) anestezi olmaları sağlandı. Anestezi edilen balıklar etil alkol ile spreylendikten sonra steril koşullarda karınları açılarak karaciğerleri dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Çıkartılan karaciğerler, kalsiyumsuz solüsyon-1 [NaCl (7.14 g/L), KCl (0.36 g/L), MgSO₄ (0.15 g/L), Na₂HPO₄ (1.6 g/L), NaH₂PO₄ (0.4 g/L), NaHCO₃ (0.31 g/L) ve EGTA (20 mg/L)] alınarak, petri kabı içerisinde, küçük parçalara ayrıldı ve dokudaki kanın iyice uzaklaşması için parçalar sivri uçlu pens yardımıyla küçültüldü. Küçültülen parçalar oda sıcaklığında 10 dk. süre ile yıkandı aynı zamanda damar ve bağ dokusu gibi kaba doku kısımları ince uçlu pensler yardımı ile uzaklaştırıldı. Bu solüsyon içerisinde kanı uzaklaşan parçalar bu kez solüsyon-1 ile aynı içeriğe sahip olan ancak EGTA yerine CaCl₂ (0.11 g/L) ve kollajenaz (Type IV, 0.05 mg/mL) içeren solüsyon-2 içerisine alındı. Karaciğer dokuları bu solüsyon içinde yaklaşık 15 dk. tritürasyon işlemine tabi tutuldu. Tritürasyon işlemi, önce kesik uçlu mavi pipet ucu ile daha sonra mavi ve sarı pipet uçları ile yapıldı. İyice ayrılan doku parçaları, bu kez steril bir enjektörün iğnesinden, sonrasında da steril bir insülin enjektörünün iğnesinden geçirilerek dokuya ait hücrelerin iyice ayrışması gerçekleştirildi. Bu işlemler tamamlandıktan sonra, elde edilen süspansiyon 60 g'de 3 dk. boyunca santrifüj edildi ve süpernatant pipetlenerek uzaklaştırıldı. Pellet üzerine, antibiyotik-antimikotik (v/v, % 1), NaHCO₃ (0.38 g/L) ve glutamin içeren serumsuz Leibovitz 15 (L-15) medyumunu eklendi. Hücreler bu medyum ile tekrar süspansiyon edildikten sonra 60 g'de 3 dk. santrifüj edildi. Bu işlem bir önceki basamaktan kalan enzimin uzaklaşması için toplam üç kez tekrar edildi. En son yıkamadan sonra medyum ile tekrar süspansiyon edilen hücreler bu defa 30 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı ve çöken hücrelerin üzerine L-15 medyum eklenerek tekrar süspansiyon olmaları sağlandı. Süspansiyon içindeki hücrelerin canlılığı, tripan mavisi eksklüzyon metodu ile Thoma lamı kullanılarak test edildi ve hücre canlılığının % 90'dan fazla olduğu belirlendi. Hücre süspansiyonunda ml'deki hücre sayısı da belirlendikten

sonra hücreler kollajen-1 kaplı 24 kuyulu mikropłakanın (Gibco, A11428-02) her kuyusuna 1×10^6 /mL olacak şekilde ekildi. Kimyasal uygulamasından önce hücreler, kuyu tabanına iyice bağlanabilmeleri için, O_2/CO_2 'siz steril inkübatörü içinde nemli hava atmosferinde, 24 saat 18 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra invert mikroskop ile incelendi (Şekil 3).



Şekil 3. Gökkuşığı alabalığından izole edilen hepatositlerin ekildikten 24 saat sonraki görüntüsü.

3.4. Hücre Kültürü Kimyasal Uygulama

Test kimyasalı olan bis(2-etilhekzil) fitalat [Di(2-etilhekzil) fitalat (DEHP); dioktil fitalat (DOP), ($C_{24}H_{38}O_4$, saflık: \geq % 98)], absolü etanol içinde çözülerek stok solüsyonu (0.1 M) hazırlandı. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonunun ardından DEHP'nin 0, 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonları hepatositlere, 24 saat süre boyunca, uygulandı. Medyum içindeki etanolün konsantrasyonu, % 0.5'i geçmeyecek şekilde ayarlandı. Her konsantrasyon için dört tekerrür yapıldı. Kontrol grubuna ait kuyudan alınan medyum ise sadece % 0.5 etanol içeren L-15

ile değiştirildi. Uygulama, O₂/CO₂'siz steril inkübatör içinde nemli hava atmosferinde ve 18 °C'de gerçekleştirildi.

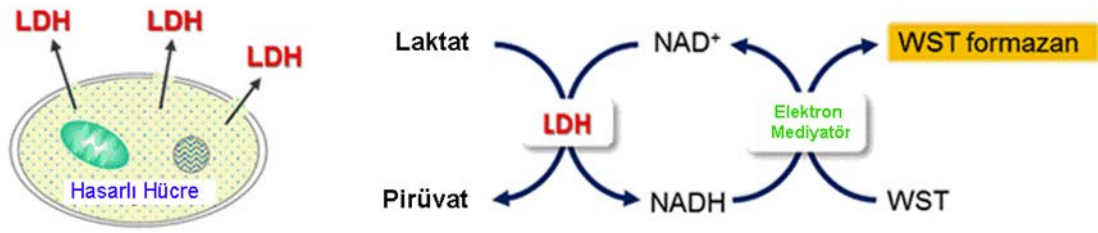
3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Laktat dehidrogenaz sitotoksisite testi

Bütün hücrelerde stabil bir enzim olarak bulunan laktat dehidrogenaz (LDH), hücrelerde plazma membran hasarı meydana geldiğinde kültür medyumuna salınır. Bu nedenle LDH, sitotoksisite çalışmalarında bir biyomarkır olarak sıklıkla kullanılır. DEHP'nin hepatositlerde oluşturduğu hasar, yukarıda sözü edilen prensibe dayanan ticari bir kitin kullanılması ve bu kitin protokolüne uyulması ile LDH'ın kültür ortamında ölçümüne dayanılarak, belirlendi. Kit içeriği Tablo 5'de belirtilmiştir. Hasarlı hücrelerden kültür medyumuna salınan LDH, laktatı oksidize ederek NADH oluşturur ve oluşan NADH, WST (suda çözünür tetrazolyum) ile reaksiyon vererek sarı renk meydana getirir (Şekil 4). Oluşan sarı rengin yoğunluğu, lizise uğrayan hücre sayısı ile direkt olarak ilişkilidir (Abcam LDH-sitotoksisite ölçüm kiti kitapçığı).

Tablo 5. LDH sitotoksisite ölçüm kiti içeriği

Kit içeriği
1. WST substrat karışımı
2. LDH ölçüm tamponu
3. Hücre lizis solüsyonu
4. Durdurma solüsyonu
5. LDH



Şekil 4. LDH-sitotoksiste ölçüm kiti çalışma prensibi (<https://www.dojindo.eu.com/store/p/851-Cytotoxicity-LDH-Assay-Kit-ST.aspx>).

DEHP uygulamaları tamamlandıktan sonra hücrelerin bulunduğu medyumdan 10 µL miktarında alındı ve alınan örnekler 96 kuyulu ELISA plakasına yüklendi. Daha sonraki aşamalar, kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Doksan altı kuyulu ELISA mikrolakasına kit protokolünde belirtildiği gibi 4 farklı tipte örnek yüklendi. Bunlar aşağıda belirtilmiştir:

1. Arka plan kontrol (AK) kuyusu: İçinde hücre bulunmayan sadece kültür medyumunun bulunduğu kuyu.
2. Düşük kontrol (DK) kuyusu: Kontrol grubuna ait hücrelerin bulunduğu kuyulardan alınan medyumunu içeren kuyu.
3. Yüksek kontrol (YK) kuyusu: İçerisine lizis solüsyonu eklenerek hücrelerin hasar verildiği kuyuya ait medyumunu içeren kuyu.
4. Test örneği (TÖ): DEHP uygulaması yapılan gruplardan alınan medyumunu içeren kuyu.

Tüm örnekler mikrolakaya yüklendikten sonra, daha önce kit prosedüründe belirtildiği şekilde hazırlanmış olan LDH reaksiyon karışımı (200 µl WST substrat karışımı + 10 mL LDH ölçüm tamponu), her kuyuya 100 µl miktarında eklendi. Sonrasında mikrolakaya hafifçe sallanarak kuyular içerisindeki sıvının karışması sağlandı ve örnekler oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Son aşamada, örneklerin absorbans (optik dansite = OD) değerleri 450 nm dalga boyunda, mikrolakaya okuyucu kullanılarak, okundu. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 tekrür yapıldı. Sitotoksiste, kit prosedüründe verilen ve aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı. Sonuçlar "% sitotoksiste" olarak ifade edildi.

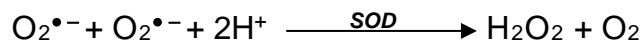
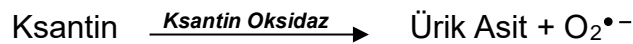
$$\text{Sitotoksiste (\%)} = \frac{(\text{TÖ absorbans değeri} - \text{DK absorbans değeri})}{(\text{YK absorbans değeri} - \text{DK absorbans değeri})} \times 100$$

3.5.2. Homojenizasyon İşlemi

Hücrelere DEHP'nin 24 saatlik uygulanmasının tamamlanmasının ardından medyum nazikçe pipetlenerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücreler, 1 mL soğuk PBS (pH: 7.4) ile süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen hücreler (1×10^6 hücre/mL) bu tampon içinde, ultrasonik hücre parçalayıcı kullanılarak, 5 s ve 5W'da lizise maruz bırakıldı. Oluşan homojenat, $20000 \times g$ 'de ve $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 15 dk boyunca, santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, tüplere aktarıldı. Elde edilen süpernatantlar total protein ve antioksidan savunma sistemi parametrelerinin analizleri için $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

3.5.3. Süperoksit dismutaz aktivitesi tayini

Prinsip: SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen toksik süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu hızlandırır. Ölçüm yönteminde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikali, 2-(2-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride (INT) ile reaksiyona girer ve kırmızı formazan boya formu meydana getirir. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesinin 505 nm 'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir. Ölçümde bir ünite SOD, INT'nin indirgenmesinin %50'lik inhibisyonunu gerçekleştirir (Suttle and McMurray, 1983).



Yöntem: SOD aktivite ölçümü Ransod kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Kit içeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Substrat karışımı	Ksantin	0.05 mmol/L
	INT	0.025 mmol/L
Tampon	CAPS	40 mmol/L, pH 10.2
	EDTA	0.94 mmol/L
Ksantin oksidaz		80 U/L
Standart		4.6 U/mL

Kör (S1) olarak, 0.01 mol fosfat tamponu (pH: 7.0) kullanıldı. Kalibrasyon stok solüsyonu 10 mL distile su içerisinde hazırlandı (4.6 U/mL). Standartlar (S2–S6), kitle belirtildiği şekilde, 0.01 mol fosfat tamponu ile kalibrasyon stok solüsyonundan seyreltilerek oluşturuldu. Ölçüm yapılırken, süpernatantın 25 µL'si küvet içerisine pipetlendikten sonra üzerine 850 µL substrat karışımı eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, bu karışımın üzerine 125 µL ksantin oksidaz ilave edildi (ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler Tablo 7'de belirtilmiştir). Küvetteki karışımın başlangıç absobansı (A_1), 505 nm'de 37 °C'de, 30 s sonra ölçüldü ve kaydedildi. Ölçüme 3 dk boyunca devam edildi ve son absorbans değeri (A_2), 3. dk'nın sonunda kaydedildi. Kör ve standartların absorbans değerlerinin ölçümleri de yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Hesaplama: Standart ve örneklere ait dakika başına düşen absorbans değeri ($\Delta A = (A_2 - A_1)/3$) hesaplandıktan sonra bütün standartlar ve örnekler için % inhibisyon değerleri aşağıdaki formüllerden yararlanılarak hesaplandı (S1 için reaksiyon inhibisyonu gerçekleştirilmediği için % inhibisyon değeri 100'dür).

$$100 - \frac{(\Delta A_{\text{standart / dk}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{kör / dk}})} = \% \text{İnhibisyon} \quad 100 - \frac{(\Delta A_{\text{örnek / dk}} \times 100)}{(\Delta A_{\text{kör / dk}})} = \% \text{İnhibisyon}$$

Standartların U/mL cinsinden bilinen konsantrasyonlarına karşılık gelen % inhibisyon değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu. Örneklerdeki SOD aktivitesi, bu eğriden elde edilen denkleme göre U/mL olarak belirlendi. Bulunan

değer, örneğin mL'sindeki total protein miktarına bölünerek SOD'un spesifik aktivite değeri hesaplandı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

Tablo 7. SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete bileşenler	pipetlenen S1 (µL)	S2-S6 (µL)	Örnek (µL)
Örnek	25	-----	-----
Standart	-----	25	-----
Örnek sulandırıcı	-----	-----	25
Substrat karışımı	850	850	850
Ksantin oksidaz	125	125	125

3.5.4. Katalaz aktivitesi tayini

Prensip: Katalaz, hidrojen peroksitin suya ve oksijene ayrışmasını katalizler:



Süpernatantlarda KAT aktivitesi 240 nm dalga boyunda H_2O_2 'nin tüketilme esasına dayanan spektrofotometrik metoda göre belirlendi (Aebi, 1974). H_2O_2 , ışığı 240 nm dalga boyunda absorbe eder. Bu yöntemle göre KAT tarafından H_2O_2 'in dekompoze olma oranı, spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda tespit edilir.

Kullanılacak solüsyonların hazırlanışı:

a. KAT fosfat tamponun hazırlanışı: Tablo 8'de belirtilmiş olan A (KH_2PO_4) ve B (Na_2HPO_4) solüsyonları, 50 mM konsantrasyon için, verilen miktarlarda tartılarak hazırlanır. Hazırlanan A ve B solüsyonları daha sonra Tablo 9'da belirtilen miktarlarda karıştırılır. Bu şekilde KAT fosfat tamponun hazırlanmış olur (pH: 7.5).

Tablo 8. KAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nin hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Kimyasal	Molekül Ağırlığı	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Solüsyon Adı
KH ₂ PO ₄	136.09 g/mol	6.805 g	1000 mL	A
Na ₂ HPO ₄ (susuz)	141.96 g/mol	7.098 g	1000 mL	B

Tablo 9. KAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları

50 mM Fosfat tamponu (1 L) (pH 7.5)	A Solüsyonu (mL)	B Solüsyonu (mL)
	160	840

b. H₂O₂ solüsyonu: Absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H₂O₂'li fosfat tamponudur. Yaklaşık 300 mL fosfat tamponu (pH 7.5, 50 mM) renkli bir cam şişeye aktarılır. Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna göre sıfırlandıktan sonra renkli şişedeki tampona 10-20 µL miktarında H₂O₂ ilave edilir ve absorbans 0.500 nm oluncaya kadar bu işleme devam edilir. H₂O₂ ilavesi yapılırken şişe ara ara karıştırılır.

Deneyin yapılışı: Örnek ve tampon kuvartz küvet içerisine Tablo 10'da belirtilen miktarlarda bırakıldıktan sonra küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve küvet hızlıca alt-üst edilerek absorbansı okunur. Absorbans azalması, her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir (aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn'de bir kayıt yapılır ve lineer azalma tespit edilirse okuma sonlandırılabilir). Hesaplama 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (A₁) ve en düşük (A₂) değerleri esas alınır.

Tablo 10. KAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Tampon	Kör (mL)	Örnek (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ solüsyonu	0.01	-
H ₂ O ₂ 'li fosfat tamponu	-	2.99
Süpernatant	-	0.01

Hesaplama: $\Delta A = \epsilon \times c \times L$, [(A: absorbans/dk, ϵ : ekstinksiyon katsayısı, c: konsantrasyon, L: ışık yolu (1 cm)]

H₂O₂'nin 240 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı: 0.0436 mM⁻¹cm⁻¹
(0.0436 mM= 0.0436 mmol/L= 0.0000436 mmol/mL= 0.436 µmol/mL=43.6 nmol/mL)

$$\text{KAT aktivitesi (nmol/dk/mL)} = \frac{\Delta A}{43.6} \times \text{Küvet içi sulandırma} \left(\frac{V_t}{V_ö} \right) \times \text{SO}$$

$$\text{KAT spesifik aktivitesi (nmol/dk/mg protein)} = \frac{\text{KAT aktivitesi (nmol/dk/mL)}}{\text{Total protein miktarı (mg/mL)}}$$

ΔA : Absorbansın 240 nm dalga boyunda dk başına değişimi

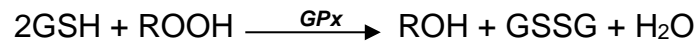
V_t: Toplam hacim

V_ö: Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

3.5.5. Glutatyon peroksidaz aktivitesi tayini

Prensip: GPx, GSH'ın kümen hidroperoksit (ROOH) ile oksidasyonunu katalizler. Oluşan oksidize glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz varlığında NADPH kullanılarak, NADP⁺'ye GSH'a dönüştürülür. Absorbanstaki düşüş 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Paglia ve Valentine, 1967).



Yöntem: Glutatyon peroksidaz aktivitesi, Ransel kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Tablo 11'de, ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler ise Tablo 12'de gösterilmiştir. Küvet içerisine süpernatanttan 20 µL bırakıldı ve üzerine 1000 µL reajan eklendi. Daha sonra bu karışıma 40 µL kümen hidroperoksit eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, örneğin ve körün başlangıç absorbanı, 340 nm dalga boyunda 37 °C'de, 1 dk

sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbans okuması 1 dk ve 2 dakika sonra tekrar edildi.

Tablo 11. GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Kit içeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Reajan	GSH GR NADPH	4 mmol/L ≥ 0.05 U/L 0.34 mmol/L
Tampon	Fosfat Tamponu EDTA	0.05 mol/L, pH: 7.2 4.3 mmol/L
Kümen hidroperoksit		0.18 mmol/L

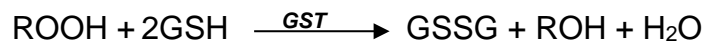
Tablo 12. GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete pipetlenen bileşenler	Örnek (µL)	Kör (µL)
Örnek	20	-----
Distile su	-----	20
Reajan	1000	1000
Kümen hidroperoksit	40	40

Hesaplama: GPx konsantrasyonu, kitte önerilen formülden ($U/L = 8412 \times \Delta A_{340}/dk$) yararlanılarak hesaplandı. Bulunan değer, U/mL'ye dönüştürüldükten sonra, örneğin mL'sindeki total protein miktarına bölünerek GPx'in spesifik aktivite değeri belirlendi. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.5.6. Glutatyon-S-transferaz aktivitesi tayini

Prensip: GST, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu GSH'ın -SH grubu ile tepkimesini katalizleyerek sağlar. Enzimin aktivitesi tayini, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)'nin GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbans artışının, 340 nm dalga boyunda ve 25 °C'de, ölçülmesine dayanır (Habig ve ark., 1974).



Yöntem: Tablo 13'deki çözeltiler sırasıyla belirtilen miktarlarda küvete eklendikten sonra, küvet iyice çalkalandı. Daha sonra absorbanstaki artış 340 nm'de, 3 dk boyunca her 30 sn'de bir kaydedildi.

Tablo 13. GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları

Küvete pipetlenen bileşen	Kör (mL)	Örnek (mL)	Son Konstrasyon (mM)
PBS (0.11 M)	2.7	2.7	100 mM
Distile su	0.1	-	-
CDNB (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
GSH (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
Süpernatant	-	0.1	-

Her örneğin absorbansındaki dk başına değişim (ΔA) belirlendikten sonra aşağıda verilen formüle göre, GST'nin molar ekstinksiyon katsayısı (9.6 mmol/L/cm) ve küvetteki sulandırma oranı hesaba katılarak, enzimin mL'deki aktivitesi belirlendi. Bulunan değer, örneğin mL'sindeki total protein miktarına bölünerek GST'nin spesifik aktivite değeri hesaplandı. Sonuçlar, nmol CDNB-glutatyon konjugatı/dk/mg protein olarak ifade edildi.

Hesaplama:

$$\text{GST aktivitesi (mmol/dk/L)} = \frac{\Delta A}{9.6} \times \frac{V_t}{V_ö} \times \text{SO}$$

$$\text{GST spesifik aktivitesi (nmol/dk/mg protein)} = \frac{\text{GST aktivitesi (nmol/dk/mL)}}{\text{Total protein miktarı (mg/mL)}}$$

ΔA : Absorbansın 340 nm'de, dk başına değişimi

V_t : Toplam hacim

$V_ö$: Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

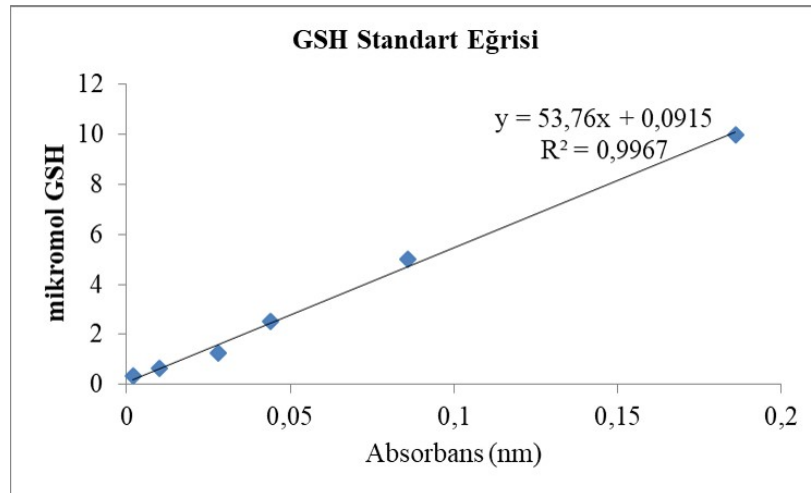
3.5.7. Redükte glutatyon tayini

Prensip: GSH içeriği, fosfat tamponu kullanılarak süpernatanttaki sülfidril gruplarının, 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin absorbansının 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümüne, dayanmaktadır (Beutler, 1984).

Ayıracılar:

1. Fosfat tamponu: 0.3 M NaH_2PO_4 distile su ile hazırlandı (pH: 6.8).
2. DTNB (Ellman Ayıracı): 40 mg DTNB'nin, % 1'lik 100 mL sodyum sitrat çözeltisi içerisinde çözünmesi ile hazırlandı.

Yöntem: Tüplerin içerisine 200 μL süpernatantlardan alındıktan sonra üzerine 1 mL fosfat tamponu eklendi. Vortekslenen tüpler, sıcak su banyosunda 60 $^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika bekletildi. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra her tüpe 200 μL DTNB ayıracı eklenerek Shimadzu UV/VIS-1201 spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda, köre karşı okuma yapıldı. Standartlar için 100 μM GSH stok çözeltisi fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı. Daha sonra stok çözeltisi seyreltilerek 10 μM ile 0.03125 μM konsantrasyon aralığında 6 adet standart hazırlandı. GSH standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğri (Şekil 5)'ye göre örneklerdeki GSH konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar μmol GSH/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 5. GSH standart eğrisi.

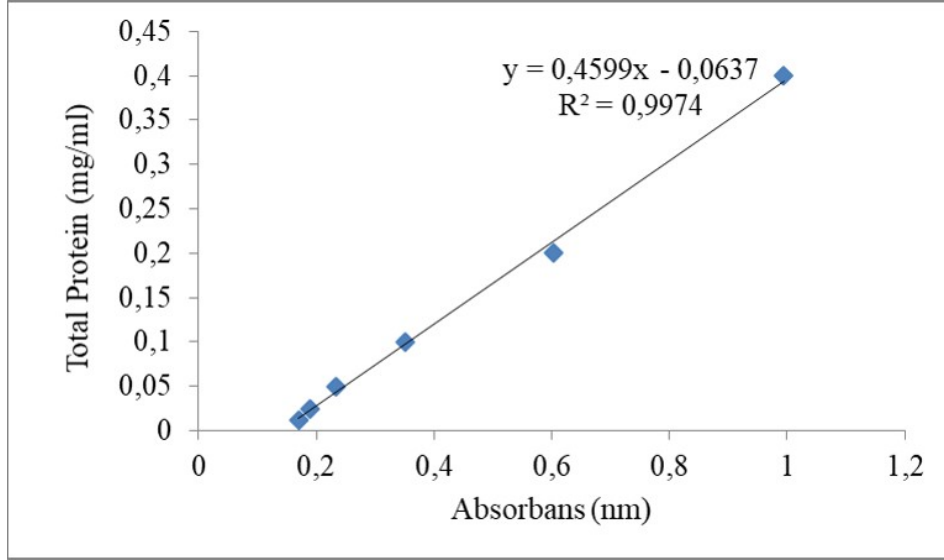
3.5.8. Total protein tayini

Antioksidan savunma sistemi parametrelerinin mg protein cinsinden ifade edilebilmesi için, her örneğe ait süpernatantta, total protein tayini yapıldı. Total protein konsantrasyonu, Bradford, (1976) metoduna göre, sığır serum albümin (BSA)'in standart olarak kullanılması ile belirlendi. Bradford metodu, proteine bağlanan Coomasie Blue G boya reaktifinin, 595 nm dalga boyundaki maksimum absorpsiyonunun, spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Ayıraçlar:

1. Konsantre Bradford solüsyonu (5x): 100 mg Coomasie Blue G, 50 mL absolüt etanol ve 100 mL ortofosforik asit (%85) içerisinde çözülür. Solüsyon distile su ile 200 mL'ye tamamlanır ve filtre edilir.
2. Bradford solüsyonu (1x): Yukarıda hazırlana solüsyonun, distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlanır.

Yöntem: Standartlar hazırlanmadan önce 10 mg/mL stok BSA hazırlandı. Stoktan seri sulandırmalar yapılarak 0.4 ile 0.0125 mg/mL aralığında 6 adet standart oluşturuldu. Örnek, kör ve standartlar Bradford solüsyonu ile muamele edildikten sonra, 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra, örnek ve standartların absorbansı, 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlara karşılık gelen absorbans değerlerine dayalı olarak standart eğri (Şekil 6) oluşturuldu. Örneklerdeki total protein konsantrasyonu eğriye ait fonksiyon kullanılarak belirlendi. Sonuçlar mg/mL protein olarak ifade edildi.



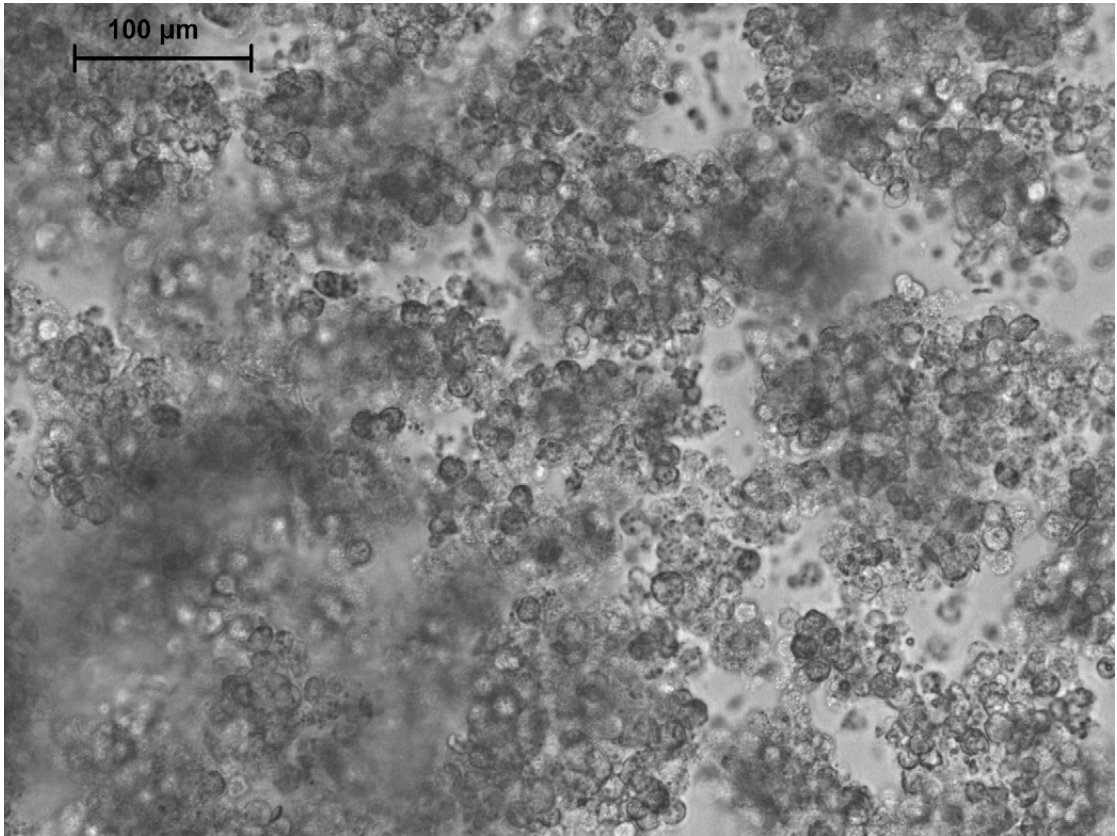
Şekil 6. Protein standart eğrisi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmadan elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 16.0 istatistik paket programında, varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için post-hoc Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Analizler sonucunda elde edilen veriler, ort \pm ss olarak ifade edildi. İstatistiksel önem derecesi $P < 0.05$ seviyesinde kabul edildi.

4. BÖLÜM BULGULAR

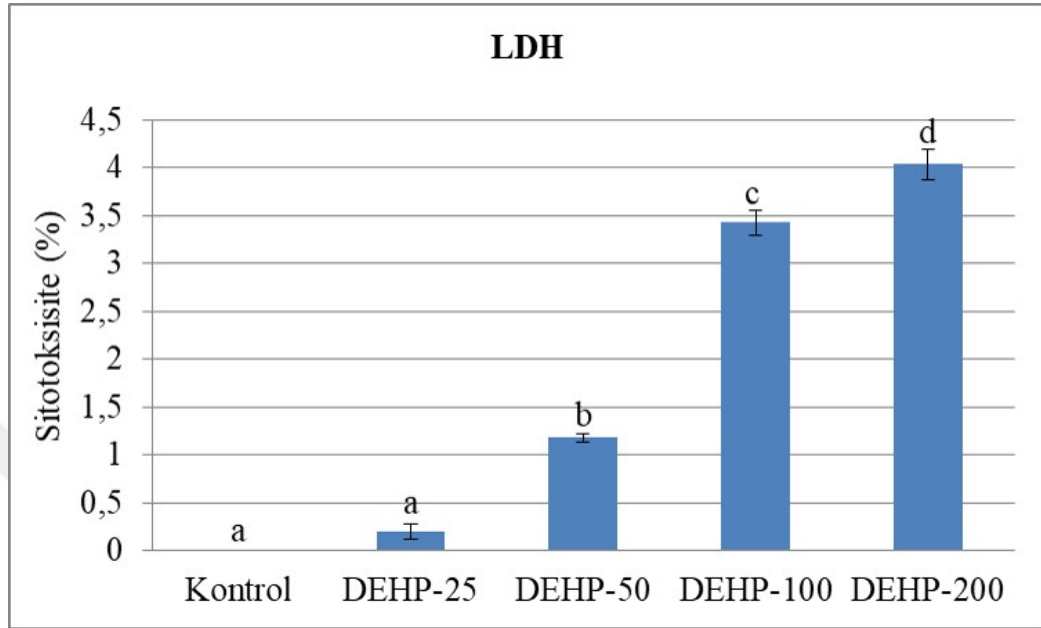
DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda, hepatositlerin kuyu tabanının orta bölgesinde hafifçe kalktıkları gözlemlendi. (Şekil 7).



Şekil 7. DEHP'nin 200 μM konsantrasyonuna maruz bırakılan hepatositlerde kuyu tabanındaki kalkmalar.

DEHP'nin, hücresel bir hasar göstergesi olan LDH'nin medyumdaki seviyesini, yükselttiği belirlendi (Şekil 4.2.). Hücre canlılığı ile ilişkili olan LDH'nin, medyuma salınımına dayanılarak yapılan sitotoksikite testine göre, DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının hücreler üzerinde sırasıyla, % 0.19, % 1.18, % 3.42 ve % 4.04 oranında sitotoksik olduğu ve bu sitotoksik etkinin

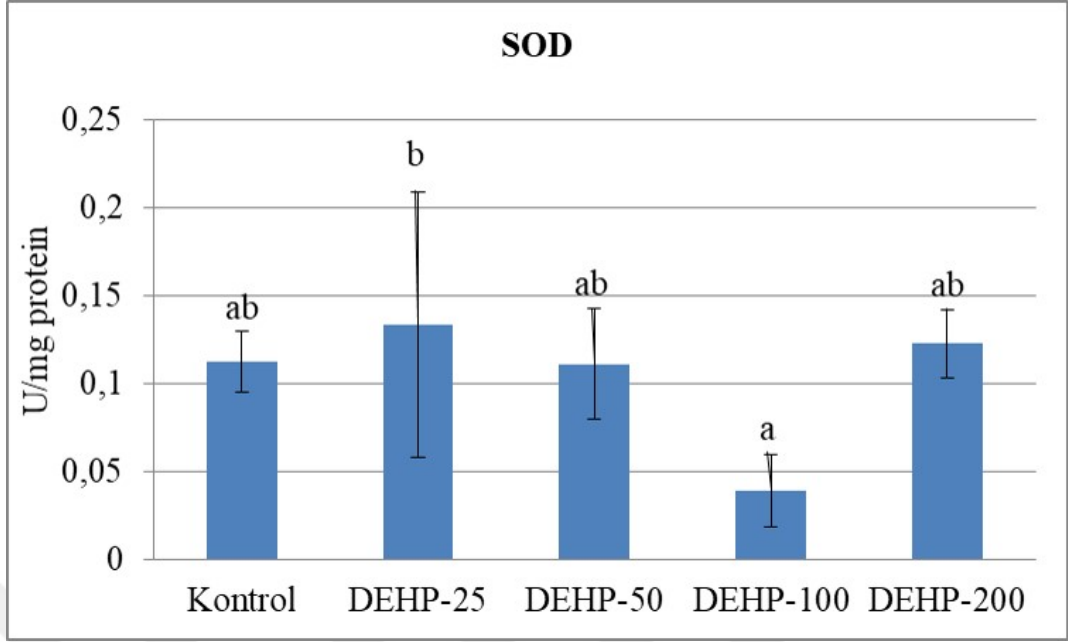
DEHP'nin 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($P < 0.05$) (Şekil 8).



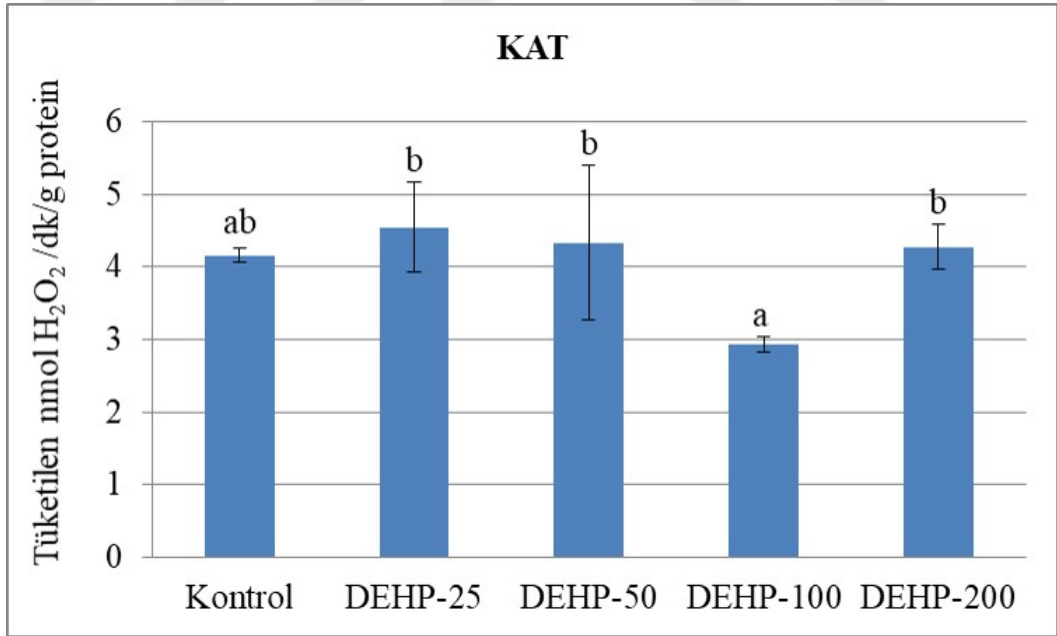
Şekil 8. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşacağı alabalığı hepatositleri üzerindeki sitotoksitesini. Sitotoksosite kültür medyumuna salınan LDH'a dayanılarak belirlenmiştir. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir ($n = 4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir ($P < 0.05$).

DEHP'ye maruz bırakılan hepatositlerde SOD aktivitesindeki değişimler, Şekil 9'da gösterilmiştir. SOD aktivitesinin DEHP'nin 25 μ M konsantrasyonuna maruz bırakılan hepatositlerde, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($P < 0.05$), DEHP'nin 100 μ M konsantrasyonunda ise anlamlı bir şekilde azaldığı belirlendi ($P < 0.05$). Öte yandan diğer uygulama gruplarında, SOD aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin meydana gelmediği gözlemlendi.

KAT aktivitesinin DEHP'nin 25, 50 ve 200 μ M konsantrasyonlarında maruz bırakılan hepatositlerde, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı ($P < 0.05$), DEHP'nin 100 μ M konsantrasyonunda ise azaldığı tespit edildi ($P < 0.05$) (Şekil 10).

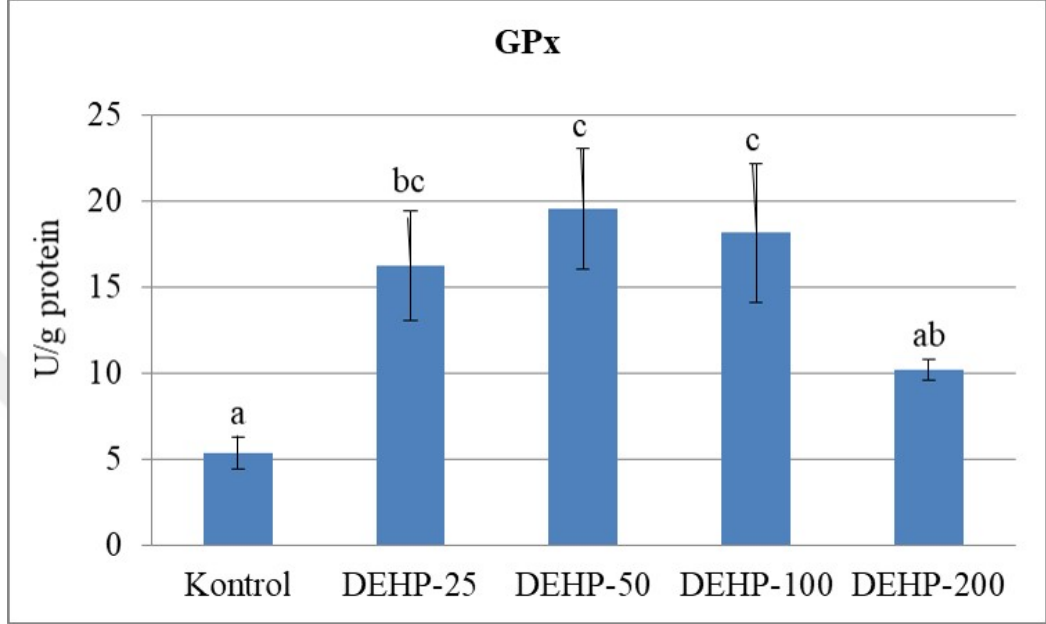


Şekil 9. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşacağı alabalığı hepatositlerinde, SOD aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).



Şekil 10. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşacağı alabalığı hepatositlerinde, KAT aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).

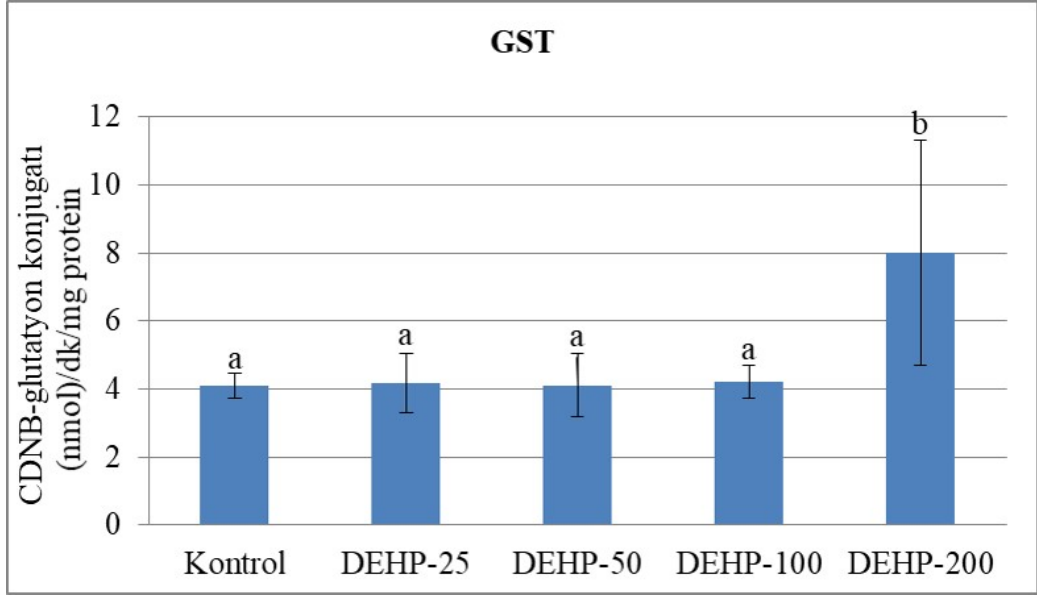
DEHP'nin hepatositlerdeki GPx aktivitesi üzerindeki etkisi, Şekil 11'de gösterilmiştir. Buna göre, DEHP'nin bütün konsantrasyonlarının GPx aktivitesini, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, artırdığı gözlemlendi ($P < 0.05$).



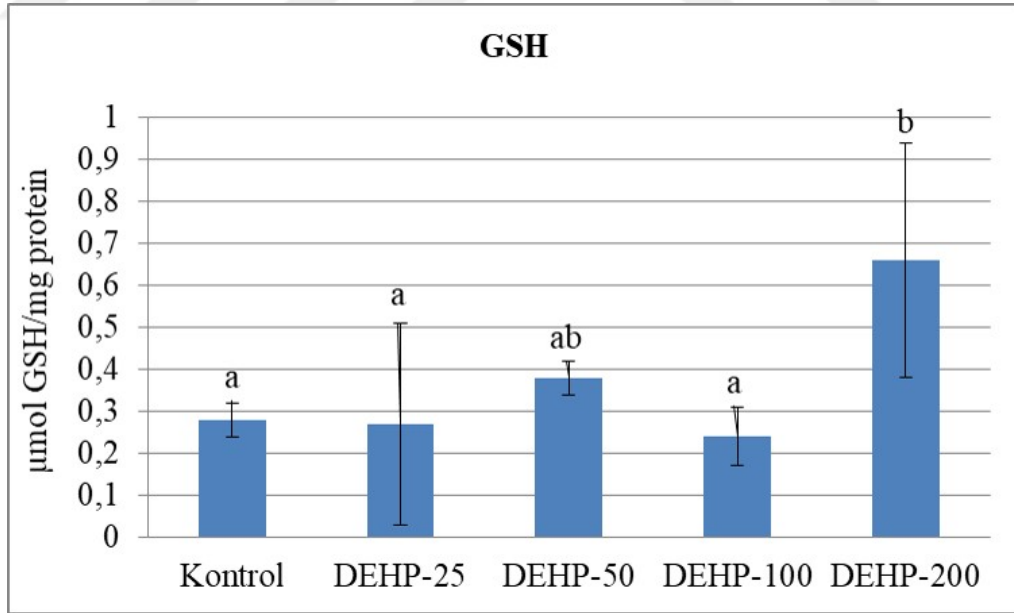
Şekil 11. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, GPx aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir ($n = 4$). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir ($P < 0.05$).

GST aktivitesinin DEHP'nin 25, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla, anlamlı bir değişim göstermediği ancak DEHP'nin 200 μM konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 12).

Hepatositlerdeki GSH seviyesinin DEHP'nin 50 ve 200 μM konsantrasyonuna maruz bırakılan gruplarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseldiği ($P < 0.05$) ancak diğer gruplarda değişmediği gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 12. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, GST aktivitesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).



Şekil 13. DEHP'nin 25, 50, 100 ve 200 μ M konsantrasyonlarının, primer kültürü yapılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerindeki, GSH seviyesi üzerindeki etkisi. Sonuçlar ort \pm ss olarak ifade edilmiştir (n = 4). Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel önem farkını göstermektedir (P < 0.05).

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstride bir plastikleştirici olarak kullanılan DEHP, esnek materyaller, inşaat malzemeleri, boyalar, oyuncaklar, gıda paketleri, intravenöz sıvı torbaları ve kan saklama torbaları gibi tıbbi gereçler ve farmasötik formülasyonlar gibi geniş bir ürün yelpazesinin üretiminde yer alır. Endüstriyel alandaki yaygın kullanımının bir sonucu olarak atık sular ile çevreye karışan DEHP, sucul ortamda ve yüzey sularında tespiti yapılmış olan bir kirleticidir (Magdouli ve ark., 2013; Zolfaghari ve ark., 2014). Son yıllarda akuatik organizmaların önemli bir grubunu oluşturan ve insanlar için başlıca besin kaynaklarından biri olan balıklarda yapılmış olan deneysel çalışmalar, DEHP'nin bu canlı grubunda endokrin bozucu (Maradonna ve ark., 2013; Ye ve ark., 2014), embriyotoksik (Mankidy ve ark., 2013) ve antioksidan sistemi sarsıcı (Zheng ve ark., 2013), negatif etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. İnsan ve diğer canlılar için ciddi risklere sahip olan bu kirleticinin oluşturduğu toksik etkilerin öğrenilmesi ve bu etkilerin altında yatan sebeplerin aydınlatılması, oldukça önemli ve gereklidir. Bu nedenle bu çalışmada, gökkuşığı alabalığından izole edilen hepatositler kullanılarak, DEHP'nin potansiyel sitotoksik etkisinin altında yatan mekanizmaların ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

LDH-sitotoksisite testinden elde edilen veriler, DEHP'nin gökkuşığı alabalığından izole edilen hücrelerde, 50 µM ve üstü konsantrasyonlarda sitotoksisiteyi anlamlı bir şekilde artırdığını göstermiştir. Benzer bulgular, DEHP'ye maruz bırakılan MA-10 Leydig hücrelerinde (Erkekoglu ve ark., 2010), mayoz öncesi fare spermatozoidleri (GC-2spd hücreleri) (Zhu ve ark., 2016), fare nöroblastoma hücreleri (Nöro-2A) (Aung ve ark., 2014) ve insan bronş epiteli 16HBE hücrelerinde (Ma ve ark., 2018) de gözlenmiştir.

SOD-KAT sistemi, antioksidan savunmada oksidatif strese karşı ilk basamağı meydana getirir. SOD, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$)'nin, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve su (H_2O)'ya dismutasyonunu gerçekleştiren bir enzimdir (Livingstone, 2003). Çalışmamızdan elde ettiğimiz deneysel sonuçlar, SOD

aktivitesinin DEHP'nin 25 µM konsantrasyonunda anlamlı bir şekilde yükseldiğini göstermiştir. Balıklarda çevresel kirleticilere maruz kalma sonucunda artan hücrel süperoksit anyon radikali düzeyi, SOD aktivitesinin uyarılmasına sebep olur. Öte yandan SOD tarafından oluşturulan H₂O₂, KAT ve GPx'in aktivitesini uyarır. KAT, bir hidroksil radikali (HO•) öncüsü olan H₂O₂'i indirgeyerek, H₂O'ya dönüştürür. SOD ve KAT aktivitesindeki eş zamanlı artışlar çevresel kirleticilere maruz kalan balıkların karaciğerinde genellikle gözlenen bir durumdur (Dimitrova ve ark., 1994; Belge Kurutaş ve ark., 2009). Dolayısıyla, SOD ve KAT aktivitelerindeki artış, DEHP maruziyeti sonrasında, O₂•⁻ ve H₂O₂ seviyelerindeki artışa atfedilebilir. Benzer olarak, fertilizasyonun 4. saatinden itibaren 96 saate kadar di-n-bütil fitalata ve dietil fitalata maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında, SOD ve KAT aktivitelerinin yükseldiği gözlenmiştir (Xu et al 2013). Diğer taraftan bu çalışmada, SOD ve KAT aktivitelerinin DEHP'nin 100 µM konsantrasyonunda eş zamanlı olarak azaldığı belirlendi. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri zenobiyotik maruziyetinin yoğunluğuna ve süresine bağımlı olarak artıp, azalabilir (Oruç ve Usta, 2007). Antioksidan enzimlerin çoğu aşırı oksidan artışı veya oksidan olan kendi substratı tarafından inaktive edilebilir (Modesto ve Martinez, 2010). Dolayısıyla O₂•⁻ radikali ve O₂•⁻ radikalinin dönüştürülmesine bağlı olarak artan H₂O₂, SOD aktivitesinde düşüşe sebebiyet vermiş olabilir. Benzer olarak, DEHP'ye maruz bırakılan (200 µM) GC-2spd hücreleri (mayoz öncesi fare spermatozoidleri)'nde SOD aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Zhu ve ark., 2016). Diğer taraftan, farklı tipteki fitalatlara maruz bırakılan havuz balığı (*Carassius auratus*)'nın karaciğerinde SOD aktivitesinin düşüş göstermesine rağmen, DEHP'ye maruz bırakılanlarda anlamlı değişim belirlenmemiştir (Zheng ve ark., 2013). Farklı bir çalışmada ise dietil fitalata 0.5, 2 ve 8 mg/L konsantrasyonlarda maruz bırakılan sazan balığında karaciğer SOD aktivitesinin, maruziyetten 2 gün sonra arttığı, 20 gün sonrasında ise azaldığı gözlenmiştir (Zhang, 2015). Çalışmamız ile uyumlu olarak DEHP'ye gavaj yolu ile 10 günlüğüne maruz bırakılan ratların testisinde Cu, Zn-SOD aktivitelerinin düştüğü rapor edilmiştir (Erkekoglu ve ark., 2014). DEHP'ye 1 mg/L konsantrasyonda maruz bırakılan koca golyan balığı (*Pimephales promelas*) embriyolarında ise SOD genlerinin mRNA ekspresyonunda önemli değişimler bildirilmemiştir

(Mankidy ve ark., 2013). Yukarıda sözü edilen çalışmalardan yola çıkılarak SOD aktivitesinin DEHP'ye maruziyet sonrasında, türe ve deney dizaynına göre de değişimler gösterebildiği söylenilebilir. Çalışmamızda KAT aktivitesinin SOD aktivitesi ile birlikte eş zamanlı olarak azaldığı belirlendi. SOD ile fonksiyonel olarak bağlantılı olan KAT'ın aktivitesindeki düşüş, SOD'un inaktive olmasından dolayı artan $O_2^{\bullet-}$ serbest radikalinden, kaynaklanabilir (Asagba ve ark., 2008; Modesto ve Martinez, 2010; Zheng ve ark., 2013). Benzer olarak, DEHP'ye 10 gün süre ile 10 mg/kg konsantrasyonda intraperitoneal olarak maruz bırakılan havuz balığı (*Carassius auratus*)'nın karaciğerinde de KAT aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Zheng ve ark., 2013). Öte yandan dietil fitalatın 100, 300 ve 900 mg/kg dozlarına intraperitoneal olarak 3 ardışık gün maruz bırakılan *Paralichthys olivaceus*'un karaciğerinde, son doz uygulandıktan 24 saat sonra KAT aktivitesi ölçülmüş, düşük dozlarda KAT aktivitesinin değişmediği en yüksek dozda aktivitenin düştüğü belirlenmiştir (Kang ve ark., 2010). Benzer şekilde, balıklarda, KAT ve SOD aktivitelerindeki eş zamanlı düşüşler, bisphenol A ve nonilfenol (Wu ve ark., 2011), kadmiyum (Cao ve ark., 2010) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlara (Otitoloji ve Olagoke, 2011) maruziyet sonrasında da rapor edilmiştir.

GPx, organik peroksitlerin ortamdaki kaldırılmasını ve hidroperoksitlerin hidroksil bileşiklere indirgenmesini, GSH'ı bir substrat olarak kullanarak, katalizleyen bir antioksidan enzimdir (Zhao ve ark., 2011). Bu çalışmada GPx aktivitesinin DEHP ile muamele edilen bütün gruplarda anlamlı bir şekilde yükseldiği belirlendi. GPx aktivitesindeki artış, DEHP etkisi ile yükselen hidroperoksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesine atfedilebilir (Wu ve ark., 2011). Öte yandan GPx aktivitesi, substratı olan GSH'ın ortamdaki varlığına da bağlıdır. Çalışmamızda beklenildiği şekilde, GPx aktivitesindeki artışlar ile eş zamanlı olarak GSH seviyesinde de artışlar gözlenmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak, DEHP'ye maruz bırakılan MA-10 Leydig hücrelerinde GPx1 aktivitesinin yükseldiği bildirilmiştir (Erkekoglu ve ark., 2010). GPx uyarımı fitalatlara maruz bırakılan farklı balık türlerinde de rapor edilmiştir. Örneğin, dietil fitalatın 300 ve 900 mg/kg dozlarına intraperitoneal olarak 3 ardışık gün maruz bırakılan *Paralichthys olivaceus*'un karaciğerinde, son doz uygulandıktan 24 saat sonra

da, GPx aktivitesinde, artış belirlenmiştir (Kang ve ark., 2010). Diğer bir çalışmada ise, dietil fitalata maruz bırakılan sazan balığında, karaciğer GPx aktivitesinin, 0.5 ve 2 mg/L konsantrasyonlarda, maruziyetten 2 gün ve 20 gün sonra arttığı ancak 8 mg/L konsantrasyonda her iki uygulama süresinde de azaldığı gözlenmiştir (Zhang, 2015). Di-n-bütil fitalat ve dietil fitalata maruz bırakılan zebra balığı larvalarında ise her iki fitalat tipinin GPx aktivitesini indüklediği belirlenmiştir (Xu ve ark., 2013).

GSH, zenobiyotiklerin metabolize ve detoksifiye edilmesinde rol oynayan önemli bir antioksidan moleküldür (Stephensen ve ark., 2002). GSH seviyesindeki artış ve azalışlar oksidatif stres ile ilişkilidir. Bu çalışmada, DEHP'nin 50 ve 200 µM konsantrasyonlarına maruz bırakılan hepatositlerde GSH seviyelerinin yükseldiği gözlemlendi. GSH seviyelerindeki artışlar, bu molekülün DEHP'nin meydana getirdiği toksik etkiyi kompanse edici özelliğine atfedilebilir (Dickinson ve Forman, 2002). Benzer şekilde, Kang ve ark., (2010) dietil fitalata 100, 300 ve 900 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak, 3 ardışık gün maruz bırakılan *Paralichthys olivaceus*'un karaciğerinde, GSH düzeyinde artışlar gözlemlenmiştir. Öte yandan, bu çalışmaya zıt olarak, DEHP'ye maruz bırakılan MA-10 Leydig hücrelerinde GSH seviyesinin düştüğü bildirilmiştir (Erkekoglu ve ark., 2010). GSH seviyesi, hafif oksidatif stres altında adaptif bir mekanizma olarak yükselebildiği gibi, şiddetli oksidatif stres altında adaptif mekanizmalardaki bozulmadan dolayı, azalabilmektedir (Zhang ve ark., 2004). Dolayısıyla GSH düzeyine ait çalışmalar arasındaki farklı bulgular, GSH'ın DEHP'nin konsantrasyonuna, hücre tipine ve meydana gelen oksidatif stresin şiddetine göre değişim göstermesinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada DEHP'ye maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde GST aktivitesinin 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda değişmediği, 200 µM DEHP konsantrasyonunda ise yükseldiği gözlemlendi. GST, elektrofilik metabolitleri GSH'a bağlayarak, zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan önemli bir faz-II enzimidir (Dickinson ve Forman, 2002). Hepatik GST aktivitesindeki artış poliaromatik hidrokarbonlar, poliklorlu bifenil ve organoklorlu pestisitler gibi, farklı tipteki toksik maddelere maruz kalan birçok balık türünde, rapor edilmiştir. Öte yandan bir çok çalışmada GST aktivitesinin,

toksik kimyasallara maruz kalım sonucunda, değişmediği yahut azaldığı da bildirilmiştir (van der Oost ve ark., 2003). DEHP'ye ve dibütil fitalata su yolu ve intraperitoneal enjeksiyon yolu ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığında, GST aktivitesinin değişmediği tespit edilmiştir (Cravedi ve Perdu-Durand, 2002). DEHP'ye gavaj yolu ile 10 günlüğüne maruz bırakılan ratların testisinde, GST aktivitelerinin anlamlı bir değişim göstermediği, rapor edilmiştir (Erkekoglu ve ark., 2014). GST aktivitesinin DEHP'ye maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında da değişmediği bildirilmiştir (Mankidy ve ark., 2013). DEHP'ye maruz bırakılan MA-10 Leydig hücrelerinde ise GST aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (Erkekoglu ve ark., 2010). Bu çalışmada GST aktivitesinde gözlenen yükselme, GST'nin GSH'ı DEHP'ye konjuge ederek, DEHP tarafından oluşturulan olumsuz etkiyi ortadan kaldırmasına atfedilebilir.

Sonuç olarak, DEHP'nin gökkuşağı alabalığından izole edilen hepatositler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve antioksidan yanıtlar meydana getirdiği gözlendi. Bu çalışmadan elde edilen veriler, balıklarda DEHP tarafından meydana getirilen hepatotoksik etkinin altında yatan sebeplerin aydınlatılmasına, katkı sunacaktır.

KAYNAKÇA

- Aebi, H. (1974). Catalase. In: Bergemeyer HU (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*, 673–684., NewYork: Academic Press.
- Almroth, B.C. (2008). *Oxidative damage in fish used is biomarkes in field and laboratory studies*. Department of Zoology/Zoophysiology, Göteborg University, Sweden: PhD Thesis.
- Asagba, S. O., Eriyamremu, G. E., Igberaese, M. E. (2008). Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(1), 61-69.
- Aung, K. H., Win-Shwe, T. T., Kanaya, M., Takano, H., Tsukahara, S. (2014). Involvement of hemeoxygenase-1 in di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)-induced apoptosis of Neuro-2a cells. *The Journal of Toxicological Sciences*, 39(2), 217-229.
- Belge Kurutaş, E., Şahan, A., Altun, T. (2009). Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of spotted barb (*Capoeta barroisi* Lortet, 1894) living in the river Ceyhan, Adana, Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 33, 275–282.
- Beutler, E. (1984). *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. Third ed.* New York: Grune and Startton, pp 105–106.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2), 248–254.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X., Dou, S. (2010). Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151(3), 386-392.
- Cravedi, J. P. & Perdu-Durand, E. (2002). The phthalate diesters DEHP and DBP do not induce lauric acid hydroxylase activity in rainbow trout. *Marine Environmental Research*, 54(3-5), 787-791.
- Dickinson, D. A. & Forman, H. J. (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 64, 1019-1026.

- Dimitrova, M. S., Tishinova, V., Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 108(1), 43-46.
- Erkekoglu, P., Giray, B., Rachidi, W., Hininger-Favier, I., Roussel, A. M., Favier, A., Hincal, F. (2014). Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on testicular oxidant/antioxidant status in selenium-deficient and selenium-supplemented rats. *Environmental Toxicology*, 29(1), 98-107.
- Erkekoglu, P., Rachidi, W., Yuzugullu, O. G., Giray, B., Favier, A., Ozturk, M., Hincal, F. (2010). Evaluation of cytotoxicity and oxidative DNA damaging effects of di (2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl)-phthalate (MEHP) on MA-10 Leydig cells and protection by selenium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 248(1), 52-62.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139.
- Kang, J. C., Jee, J. H., Koo, J. G., Keum, Y. H., Jo, S. G., Park, K. H. (2010). Anti-oxidative status and hepatic enzymes following acute administration of diethyl phthalate in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, a marine culture fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(6), 1449-1455.
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154(6), 427-430.
- Ma, Y., Guo, Y., Wu, S., Lv, Z., Zhang, Q., Xie, X., Ke, Y. (2018). Analysis of toxicity effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure on human bronchial epithelial 16HBE cells. *Cytotechnology*, 70(1), 119-128.
- Magdoui, S., Daghrir, R., Brar, S. K., Drogui, P., Tyagi, R. D. (2013). Di 2-ethylhexylphthalate in the aquatic and terrestrial environment: a critical review. *Journal of Environmental Management*, 127, 36-49.
- Mankidy, R., Wiseman, S., Ma, H., Giesy, J. P. (2013). Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 217(1), 50-58.

- Maradonna, F., Evangelisti, M., Gioacchini, G., Migliarini, B., Olivotto, I., Carnevali, O. (2013). Assay of vtg, ERs and PPARs as endpoint for the rapid in vitro screening of the harmful effect of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and phthalic acid (PA) in zebrafish primary hepatocyte cultures. *Toxicology in Vitro*, 27(1): 84-91.
- Martins, K., Applegate, B., Hagedorn, B., Kennish, J., Zwollo, P. (2015). Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits B cell proliferation and reduces the abundance of IgM-secreting cells in cultured immune tissues of the rainbow trout. *Fish and Shellfish Immunology*, 44(1), 332-341.
- Modesto, K. A. & Martinez, C. B. (2010). Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294-299.
- Monterio, D. A., de Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 143, 141–149.
- Mortensen, A. S., Tølfen, C. C., Arukwe, A. (2006). Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69, 1-19
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), (1992). *OECD guideline for testing of chemicals*. Test no. 203: acute fish test.
- Oruç, E. Ö. & Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23(1), 48-55.
- Otitoloju, A. & Olagoke, O. (2011). Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in *Clarias gariepinus* as useful biomarkers for monitoring exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Monitoring and Assessment*, 182(1-4), 205-213.

- Pesonen, M. & Andersson, T. B. (1997). Fish primary hepatocyte culture; an important model for xenobiotic metabolism and toxicity studies. *Aquatic Toxicology*, 37(2-3), 253-267.
- Paglia, D. E. & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70, 158–169.
- Segner, H. (1998). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 71-81.
- Staples, C. A., Peterson, D. R., Parkerton, T. F., Adams, W. J. (1997). The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere*, 35, 667-749.
- Stephensen, E., Sturve, J., Forlin, L. (2002). Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 144, 191-196.
- Sun, X., Lin, Y., Huang, Q., Shi, J., Qiu, L., Kang, M., ... & Dong, S. (2015). Di (2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(3), 581-594.
- Suttle, N. F. & McMurray, C. H. (1983). Use of erythrocyte copper: zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Research in Veterinary Science*, 35(1), 47-52.
- Tollefsen, K. E., Blikstad, C., Eikvar, S., Finne, E. F., Gregersen, I. K. (2008). Cytotoxicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a primary culture of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69, 64–73.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.

- 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.
- Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Wu, X., Yang, L. (2013). Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 39-44.
- Ye, T., Kang, M., Huang, Q., Fang, C., Chen, Y., Shen, H., Dong, S. (2014). Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, 146, 115-126.
- Zhang, G. (2015). Effect of diethyl phthalate on biochemical indicators of carp liver tissue. *Toxin Reviews*, 34(1), 21-27.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y. (2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish, *Carrasius auratus*. *Chemosphere*, 55, 167-174.
- Zhao, A. J., Liu, H. Q., Zhang, A. N., Wang, X. D., Zhang, H. Q. (2011). Effect of BDE-209 on glutathione system in *Carrasius auratus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 35-39.
- Zheng, Q., Feng, M., Dai, Y. (2013). Comparative antioxidant responses in liver of *Carassius auratus* exposed to phthalates: an integrated biomarker approach. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 741-749.
- Zhu, L., Lu, J., Tang, X., Fu, G., Duan, P., Quan, C., Zhang, L., Zhang, Z., Chang, W., Shi, Y. (2016). Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis of GC-2spd cells via TR4/Bcl-2 pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44, 18-24.
- Zolfaghari, M., Drogui, P., Seyhi, B., Brar, S. K., Buelna, G., Dubé, R. (2014). Occurrence, fate and effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants: A review. *Environmental Pollution*, 194, 281-293.



LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Eğitim Bilimleri Enstitüsü

25 /06/2019

Tez Başlığı / Konusu

Di(2-etilhekzil) fitalat' ın gökkuşacağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) primer hepatositleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 25 (yirmi beş) sayfalık kısmına ilişkin, 25/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4 (Yüzde dört)' tür.

Uygulanan Filtreler Aşağıda Verilmiştir:

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

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

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

25/06/2019

Gurbet CEYLAN KAPTANER

Adı Soyadı : Gurbet CEYLAN KAPTANER

Öğrenci No : 159401073

Anabilim Dalı : Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalı

Programı : Biyoloji Eğitimi Bilim Dalı

Statüsü : Yüksek Lisans Doktora

DANIŞMAN

25/06/2019

Dr. Öğr. Üyesi Bedia BATI

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

25/06/2019

Enstitü Sekreteri