

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

**17 α -ETİNİLESTRADİOL VE NONİLFENOLE MARUZ BIRAKILAN İNCİ
KEFALİNDE (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) TOKSİSİTEYE BAĞLI BAZI
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Burak KAPTANER
DANIŞMAN: Prof. Dr. Güler ÜNAL

VAN-2008

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

**17 α -ETİNİLESTRADİOL VE NONİLFENOLE MARUZ BIRAKILAN İNCİ
KEFALİNDE (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) TOKSİSİTEYE BAĞLI BAZI
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Burak KAPTANER

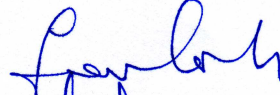
VAN-2008

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Güler ÜNAL danışmanlığında, Burak KAPTANER tarafından sunulan “17 α -Etinilestradiol ve Nonilfenole Maruz Bırakılan İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) Toksikiteye Bağlı Bazı Değişimlerin Araştırılması” isimli bu çalışma “Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği” ve “Fen Bilimleri Enstitüsü Yönergesi”nin ilgili hükümleri gereğince 22/08/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Osman PARLAK

İmza:



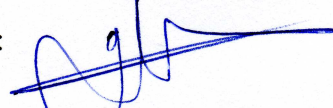
Üye: Prof. Dr. Güler ÜNAL

İmza:



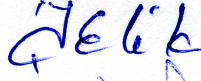
Üye: Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İmza:



Üye: Doç. Dr. İsmail ÇELİK

İmza:

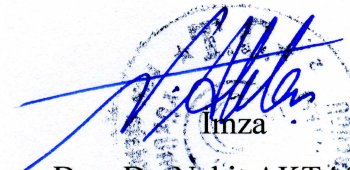


Üye: Doç. Dr. Ender ERDOĞAN

İmza:



Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15/09/2008 tarih ve 2008/19-V... sayılı kararı ile onaylanmıştır.


İmza
Doç. Dr. Nahit AKTAS
Enstitü Müdürü

ÖZET

17 α -ETİNİLESTRADİOL VE NONİLFENOLE MARUZ BIRAKILAN İNCİ KEFALİNDE (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) TOKSİSİTEYE BAĞLI BAZI DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

KAPTANER, Burak

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Güler ÜNAL

Eylül 2008, 101 sayfa

Bu çalışmada, 17 α -etinilestradiol (EE; 1, 10 ve 100 ng/l) ve nonilfenolün (NP; 10, 60 ve 200 μ g/l) nominal konsantrasyonlarına, semistatik koşullarda kronik olarak (32 gün) maruz bırakılan inci kefalinde karaciğer ve gonad apoptozu, gonad histopatolojisi, plazma steroid seviyeleri ve karaciğerde CYP1A enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu araştırıldı. Bunun yanında 24 saat süre ile EE ve NP'nin 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonları ile inkübe edilen kültürü yapılmış inci kefalı karaciğer hücrelerinde, apoptotik hücre ölümü, flow sitometri ile analiz edildi. Apoptoz, histolojik kesitlerde TUNEL metodu ile değerlendirildi. EE ve NP'nin karaciğerde hepatosit ölümünü, ovaryumda folikül başına düşen apoptotik somatik hücre sayısını ve testiste seminifer tübül başına düşen apoptotik germ hücre sayısını konsantrasyon artışı ile birlikte artırdığı ve bu artışların en yüksek konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. EE ve NP uygulanan gruplarda ovaryum yüzde atretik oosit sayısının arttığı ancak bu artışın NP uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Ovaryumda stromal bağ dokuda kalınlaşma da belirlendi. Testiste ise intersititiyal bağ dokuda kalınlaşmanın yanı sıra ovotestis gözlemlendi. NP ve EE uygulanan gruplarda plazma 17 β -östradiol seviyeleri değişim göstermedi bununla birlikte plazma testosteron seviyeleri EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda hem dişi hem de erkek bireylerde belirlenemedi. Karaciğerde CYP1A enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonunda NP uygulanan gruplarda kontrol bireyelerine

kıyasla bir fark gözlenmezken, EE uygulanan gruplarda hepatosit sitoplazmasında CYP1A immunboyanmasının, nukleus membranından plazma membranına doğru arttığı gözlemlendi ancak boyanmanın orta şiddetli olduğu belirlendi. EE ve NP'nin hepatosit kültürlerinde hücre ölümünü anlamlı olarak artırmadığı gözlemlendi. Bu sonuçlar, EE ve NP'nin in vivo'da toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Chalcalburnus tarichi*, Karaciğer, Ovaryum, Testis, Apoptoz, CYP1A, 17 β -Östradiol, Testosteron, Hepatosit Kültürü, Flow Sitometri.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME TOXICITY DEPENDENT ALTERATIONS IN İNCİ KEFALİ (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) EXPOSED TO 17 α - ETHINYLESTRADIOL AND NONYLPHENOL

KAPTANER, Burak

PhD Thesis, Biology Science

Supervisor: Prof. Dr. Güler ÜNAL

September 2008, 101 pages

In the present study, liver and gonadal apoptosis, gonad histopathology, plasma steroid levels and immunohistochemical localization of CYP1A enzyme were investigated in *Chalcalburnus tarichi*, chronically (32 days) exposed to nominal concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE; 1, 10 ve 100 ng/l) and nonylphenol (NP; 10, 60 ve 200 μ g/l) at semistatic conditions. Furthermore apoptotic cell death was analyzed by flow cytometer in cultured liver cells of *C. tarichi* incubated 24 h with 0,1, 1 and 10 μ M concentrations of EE and NP. Apoptosis was evaluated in blinded histological sections by TUNEL method. EE and NP were observed to increase hepatocyte death, apoptotic somatic cell number per follicle in ovary and apoptotic germ cell number per seminiferous tubule in testis along with concentration rising and these increases were statistically significant at the highest concentrations. Percentage of atretic oocyte number in ovary was determined to increase in EE and NP exposed groups however not significant in NP exposed groups. Thickening of stromal connective tissue was also observed in ovary. In testis, thickening of interstitial connective tissue as well as ovotestis were observed. Plasma 17 β -estradiol levels did not change in either EE or NP exposed groups however, plasma testosterone levels were not detected in both females and males at 100 ng/l EE concentration. In liver, while no difference was observed in immunohistochemical localization of CYP1A enzyme of NP exposed groups compared to controls, CYP1A immunostaining was observed to increase in hepatocyte cytoplasm,

extending from nuclear membrane to plasma membrane but moderate staining was determined in EE exposed groups. EE and NP did not significantly induce cell death in hepatocyte cultures. These results show that *in vivo* exposure to EE and NP have toxic effects on *C. tarichi*.

Key Words: *Chalcalburnus tarichi*, Liver, Ovary, Testis, Apoptosis, CYP1A, 17 β -Estradiol, Testosterone, Hepatocyte Culture, Flow Cytometer.

ÖN SÖZ

Sinir ve bağışıklık sistemi ile bağlantılı olan endokrin sistem, insan ve hayvanlarda önemli fonksiyonları kontrol ederek düzenleyici mekanizmayı meydana getirir. Özelleşmiş bezlerden sentezlenen ve salgılanan hormonlar, bu sistemin mesajcıları olup işlevlerini vücut sıvıları ya da komşuluk yoluyla hedef organlara ulaşarak gerçekleştirirler. Hormonlar büyüme, gelişim, üreme, metabolizma, kas ve sinir fonksiyonları, kan basıncı ve glukoz seviyesinin düzenlenmesi, kanda iyon seviyesinin normal düzeylerde kalması gibi vücudun iç dengesinin korunmasında rol oynayan moleküllerdir. Bu moleküller reseptörlerine anahtar kilit modeline benzer şekilde bağlanarak etki gösterirler. Hormonların vücuttaki dengesi ise merkezi sinir sistem, hipofiz ve hedef organlar arasındaki geri bildirim (feed back) mekanizması ile kontrol edilir. Ancak; bu kompleks sistem, organizmaya zarar verici endokrin bozuculara oldukça duyarlıdır.

Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalar, çevrede bulunan kimyasalların insanların ve yaban hayattaki canlıların endokrin sistemlerinin normal fonksiyonunu bozduğunu, karaciğer ve diğer organlarda da zarara neden olduğunu göstermektedir. Bu kimyasallar zenoöstrojenler, endüstriyel kimyasallar, ürün koruyucular, zirai ilaçlar gibi insan yapımı olabildiği gibi flavonoidler, genistein gibi fitoöstrojenler ve insan ile hayvanlar tarafından atılan doğal cinsiyet steroidleri de olabilirler. İnsan ve hayvanların endokrin ve üreme sistemlerinde oluşturabildikleri zararlar ve diğer olumsuz etkilerinden dolayı bu kimyasallar, endokrin bozucular olarak adlandırılmıştır. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı Endokrin Bozulmuş İş Gücü (EDSTAC) bir endokrin bozucuyu bilimsel prensiplere, bilgiye, delilin önemine ve tedbire yönelik prensibe dayalı, organizma, nesilleri, popülasyonları veya organizmaların altpopülasyonları seviyesinde ters etkilere neden olan ve endokrin sistemin yapısını veya fonksiyonunu(larını) değiştiren eksojen bir kimyasal madde veya karışım olarak tanımlamıştır (Lintellmann ve ark., 2003). Endokrin bozucular etkilerini direkt olarak reseptörler ile agonistik ve antagonistik etkileşimler sonucunda ya da indirekt olarak aromataz ve sitokrom p450 grubu enzimler ile etkileşerek gösterebilirler.

Endokrin sistemi bozucu kimyasalların insanlarda testis, prostat ve meme kanseri görülme sıklığında artışa, sperm sayısı ve kalitesinde zamana bağımlı olarak düşmelere, kriptorşizm (inmemiş testis) ve hipospadia (penis malformasyonu) insidansında artışa, polikistik ovaryum ve çocuklarda fiziksel ve mental gelişimde değişime neden oldukları belirlenmiştir.

Florida panterlerinde ve foklarda gözlenen fertilitate bozukluğu, poliklorlu bifeniller ve diğer organoklorin kimyasalların kirliliğine atfedilmiştir.

Endokrin bozucuların kuşlarda gözlenen olumsuz etkileri arasında martılarda anormal pençe büyüklüğü ile birlikte anormal kuluçka davranışı ve dişi-dişi çiftleşmesi vardır. DDT'nin erkek martı embriyolarının feminizasyonuna, üreme davranışında değişime ve dişilerde yumurta kabuğunda incelmeye sebep olduğu bildirilmiştir.

1980'lerde Apopka gölüne (Florida) organoklorin pestisit dikofolün dökülmesinden sonra, timsah popülasyonunda düşüş görülmüştür. Bu timsahların daha az kirlenen bölgelerdeki (Woodruff gölü) timsahlara kıyasla anormal gelişen üreme organlarına ve değişmiş hormon seviyelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Kontaminasyonun olduğu gölde, erkek bireylerde fertilitenin olumsuz olarak etkilendiği ve yumurta canlılığının azaldığı rapor edilmiştir.

Amfibilerde ise endokrin bozucuların yol açtığı en önemli olumsuzlukların üye deformitesi ve popülasyon sayısında azalma olduğu bildirilmiştir.

Molusklarda endokrin bozuculara maruz kalma sonucunda erkek cinsiyet karakteri gösteren dişi bireyler (imposeks) meydana geldiği ve üreme yeteneğinin kaybedildiği bilinmektedir.

Endokrin bozucu kimyasallar sediment, yüzey suları, göller ve denizlerde belirlenmektedir. Su sistemlerindeki konsantrasyonlarının artmasından dolayı bu kimyasallardan etkilenen canlıların başında balıklar gelmektedir. Balıklarda gözlenen olumsuz etkilerinin başında, dişiye özgü karakterlerin erkek bireylerde gözlenmesi ve organ toksisitesi gelmektedir. Yapılan çalışmalar bu kimyasalların balık dokularında biriktiklerini de ortaya koymuştur. Balıkların insanlar tarafından tüketilmesi ile bu kimyasallar insanlara geçebilmektedir.

İnci kefalı, Van gölü Havzası'nda yaşayan endemik bir sazan türüdür. Balık bölgede besin kaynağı olarak kullanıldığı için ekonomik bir öneme sahiptir. Endokrin bozucu kimyasalların inci kefalinde meydana getirdikleri olumsuz etkilere ilişkin bir

çalışmaya rastlanmamıştır ve oluşturabilecekleri olumsuz etkiler bilinmemektedir. 17 α -etinilestradiol gebelik önleyici hapların ana bileşeni olan sentetik bir östrojendir. Nonilfenol ise plastik yapımında, deterjan ve herbisit üretiminde, spermisit uygulamalarda kullanılan alkilfenol polietoksilatların bir indirgenme ürünüdür. Atık su arıtma sularında da bu kimyasalların varlığı tespit edilmiştir. Van gölünün kapalı bir havza olması ve bu kimyasalların göle, çevresinde bulunan yerleşim alanlarından atık sular vasıtasıyla karışması ve konsantrasyonlarının artması muhtemeldir. Bu yüzden gölde yaşayan tek omurgalı türü olan inci kefalinde bu kimyasalların oluşturacağı olumsuzlukların iyi bilinmesi gerekir. Bu çalışmada endokrin bozucu kimyasallar olan 17 α -etinilestradiol ve nonilfenolün inci kefalinde meydana getirdiği olumsuz etkiler araştırıldı.

Bu çalışmanın yapılması sırasında özverili yardımlarından ve desteğinden dolayı; Danışman Hocam Prof. Dr. Güler ÜNAL'a; çalışmanın izlenmesinde, değerlendirilmesinde ve yönlendirilmesindeki yardım ve katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Osman PARLAK ve Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e; deney materyalinin sağlanmasında, yardımlarını eksik etmeyen Su Ürünleri Bölümü Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. Mahmut ELP ve Yrd. Doç. Dr. Fazıl ŞEN'e; çalışmam boyunca desteklerinden dolayı Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. H. Murat SİPAHİOĞLU'na; Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ender ERDOĞAN'a; Biyoloji Bölümü Öğretim Doç. Dr. İsmail ÇELİK'e; deney ortamının hazırlanmasında, deney materyali bakımı ve beslenmesinde, çalışmamın başından sonuna kadar yardım ve desteğini eksik etmeyen Arş. Gör. Dr. Ertuğrul KANKAYA'ya; tez çalışmam sırasında yardımlarından ve desteklerinden dolayı Arş. Gör. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ, Arş. Gör. Emre EREZ, Arş. Gör. Elçin YENİDÜNYA, Arş. Gör. Melike DOĞRUÖZ ve Arş. Gör. S. Mesut PINAR'a ve ismini yazamadığım tüm arkadaş ve dostlarıma; yetişmemde emeği geçen, maddi ve manevi destekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan ve her zaman yanımda olan anneme, babama, kardeşime ve tüm aile fertlerime teşekkürü bir borç bilirim.

Burak KAPTANER
Van-2008

İÇİNDEKİLER

	sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	4
2.1. EE, NP ve balıklar ile diğer bazı sucul canlılar üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar	4
2.2. EE ve NP'nin plazma steroid seviyeleri üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar	7
2.3. Apoptoz, çevresel kirleticilerin apoptoza olan etkileri ile ilgili çalışmalar	9
2.4. CYP1A	13
2.5. İnci kefali ile ilgili çalışmalar	17
2.6. Çalışmanın amacı	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Balık temini	20
3.2. Deneysel dizayn ve kimyasal uygulama	21
3.3. Doku Alınması	22
3.4. Histoloji, cinsiyet belirlenmesi ve yaş tayini	23
3.5. TUNEL (Terminal transferase mediated dUTP nick end labelling)	23
3.5.1. Apoptozun kantifikasyonu ve atretik oosit sayımı	25
3.6. CYP1A enziminin immunohistokimyası	26
3.7. Plazma steroid seviyeleri	27

3.8. Karaciğer hücre izolasyonu ve kültürü	27
3.9. Hücre kültürü kimyasal uygulama	28
3.10. Hücre süspansiyonunda TUNEL ve PI çift boyama	29
3.11. Flow (akım) sitometride apoptotik hücre sayımı	30
3.10. İstatistiksel analizler	30
4. BULGULAR	32
4.1. Gonad histolojisi ve yaş tayini	32
4.2. Apoptoz ve gonad histopatolojisi	33
4.3. CYP1A enziminin hepatositlerdeki immunohistokimyası	60
4.4. Plazma 17 β -östradiol ve testosteron seviyeleri	66
4.5. Hücre kültürü	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
5.1. Apoptoz ve gonad histopatolojisi	73
5.2. CYP1A	79
5.3. Plazma steroid seviyeleri	81
5.4. Hücre Kültürü	84
5.5. Sonuç	85
KAYNAKLAR	86
ÖZ GEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	sayfa
Şekil 3.1. Deney materyali inci kefalinin Karasu çayından yakalandığı andan bir görünüm.	20
Şekil 3.2. İnci kefaline EE ve NP uygulamasının yapıldığı deneme ortamından bir görünüm.	22
Şekil 3.3. Denemede kullanılan inci kefalinden bir örnek (<i>Chalcalburnus tarichi</i> , Pallas 1811).	22
Şekil 4.1a. Kontrol grubuna ait erkek inci kefalinde prespermatogenik safhadaki testis, (Mallory trikrom).	32
Şekil 4.1b. Kontrol grubuna ait dişi inci kefalinde erken vitellogenik safhadaki oositleri içeren ovaryum, (Pn: perinükleer oosit; Vo: vitellogenik oosit; Mallory trikrom).	33
Şekil 4.2a,b. Dişi inci kefalinde, kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başı: apoptotik hepatosit; MV: merkezi ven).	38
Şekil 4.3a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).	39
Şekil 4.3c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hücreler; MV: merkezi ven).	40
Şekil 4.4a. NP'nin 10 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).	40
Şekil 4.4b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile	

boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; BKD: büyük kan damarı).	41
Şekil 4.5a,b. Dişi inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri.	42
Şekil 4.6a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hücreler; S: stromal doku; AO: atretik oosit).	43
Şekil 4.6c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hücreler; S: stromal doku).	44
Şekil 4.7a. NP'nin 10 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başı: apoptotik folikül hücresi).	44
Şekil 4.7b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik folikül hücreleri).	45
Şekil 4. 8a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 200 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitlerinde atretik oositler (*) ve atretik oositte apoptotik folikül hücreler (ok başları).	46
Şekil 4.9a,b. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinin ovaryumunda, stromal dokuda kalınlaşma (fibrozis), (*: atretik oosit; ok başları: fibrotik alanlar; Mallory trikrom).	47
Şekil 4.9c. NP'nin 200 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalini ovaryumunda, stromal dokuda kalınlaşma (fibrozis), (*: atretik oosit; ok başları: fibrotik alanlar; Mallory trikrom).	48

Şekil 4.10a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 200 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryumundan alınan kesitlerde stromal dokudaki apoptotik hücreler (ok başları), (TUNEL).	49
Şekil 4.11a,b. Erkek inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait karaciğer dokusunun, TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).	50
Şekil 4.12a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; KD: kan damarı).	51
Şekil 4.12c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hepatositler; KD: kan damarı).	52
Şekil 4.13a. NP'nin 10 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başı: apoptotik hepatosit).	52
Şekil 4.13b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; KD: kan damarı).	53
Şekil 4.14a,b. Erkek inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başı: apoptotik germ hücresi).	54
Şekil 4.15a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri).	55
Şekil 4.15c. EE'nin 100 ng/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci	

- kefalinde testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri). 56
- Şekil 4.16a. NP'nin 10 µg/l (a) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri). 56
- Şekil 4.16b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri). 57
- Şekil 4.17a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste ovotestis oluşumu, (Ok başları: perinuklear oositler; Hematoksilen eozin). 58
- Şekil 4.18a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste intersititiyal doku kalınlaşması (fibrozis), (Ok başları; Mallory trikrom). 59
- Şekil 4.18c. NP'nin 200 µg/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste intersititiyal doku kalınlaşması (fibrozis), (Ok başları; Mallory trikrom). 60
- Şekil 4.19a,b. İnci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) grubu bireylerinin karaciğer dokusundan alınan kesitlerde CYP1A enzimine ait immun boyama. CYP1A immunreaksiyonu hepatositlerin sadece perinuklear alanlarında gözlenirken; sitoplazmik alanlarında gözlenmedi (iç kare bar: 10 µm). 62
- Şekil 4.20a,b. NP'nin 10 µg/l (a) ve 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde CYP1A immun boyaması. Her iki konsantrasyonda da hepatositlerin, kontrollere benzer olarak sadece perinuklear alanda CYP1A immun reaksiyonu gözlenirken; sitoplazmik alanda

- gözlenmedi(iç kare bar: 10 μ m). 63
- Şekil 4.20c. NP'nin 200 μ g/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitinde CYP1A immunboyaması. Kontrollere benzer olarak sadece hepatositlerde perinükleer alanda CYP1A immun reaksiyonu gözlenirken; sitoplazmik alanda gözlenmedi.boyama. Kontrollere benzer olarak sadece perinükleer alanda CYP1A immun reaksiyon gözlenirken sitoplazmik alanda gözlenmedi (iç kare bar: 10 μ m). 64
- Şekil 4.21a. EE'nin 1 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitinde hepatositlerde perinükleer alanda gözlenen CYP1A immun reaksiyon (iç kare bar: 10 μ m). 64
- Şekil 4.21b,c. EE'nin 10 ng/l (b) ve 100 ng/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde, hepatosit sitoplazmasında gözlenen CYP1A immun reaksiyonu (iç kare bar: 10 μ m). 65
- Şekil 4.22a,b. İnci kefalinde kültüre alınan karaciğer hücrelerinin görüntüleri. a) Kültüre alındıktan hemen sonra, b) Kültüre alındıktan 24 saat sonra. 70
- Şekil 4.23. EE (a) ve NP'nin (b) 10 μ M konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline karaciğer hücrelerinde, kontrol grubu hücrelerinde (c), pozitif kontrol hücrelerinde (d) ve negatif kontrol hücrelerinde (e), TUNEL-PI çift boyanan apoptotik hücrelerin flow sitometrik analizi sonucunda elde edilen histogramlar. Histogramlarda sağ üst kareler, apoptotik hücreleri (+/+; PI⁺/FITC⁺); sol üst kareler apoptotik olmayan hücreleri, (+/-; PI⁺/FITC⁺); sol alt kareler boyanmayan yapıları, (-/-; PI⁻/FITC⁻); sağ alt kareler ise artefekt yapılarını (-/+; PI⁻/FITC⁺), göstermektedir. 71
- Şekil 4.24. EE ve NP'ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 μ M

konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefali karaciğer hücrelerinde apoptoz yüzdesi. Değerler her grup için birbirinden bağımsız üç deneyin (n = 3) Ort.±S.H.'sı olarak ifade edildi.

72

ÇİZELGELER DİZİNİ

	sayfa
Çizelge 4.1. 17α -Etinilestradiol (EE) ve Nonilfenole (NP) maruz bırakılan dişi inci kefalinde karaciğer ve ovaryum dokularında meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantitatif analiz sonuçları, ovaryum % atretik oosit sayısı ve ovaryumunda stromal bağ dokuda kalınlaşmaya sahip birey sayıları. Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Ort. \pm S.H. ve medyan (<i>m</i>) olarak ifade edildi	36
Çizelge 4.2. 17α -Etinilestradiol (EE) ve Nonilfenole (NP) maruz bırakılan erkek inci kefalinde karaciğer ve testis dokularında meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantitatif analiz sonuçları, testiste intersititiyal bağ doku kalınlaşmasına (fibrozis) ve ovotestis şekillenmesine sahip birey sayıları. Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Ort. \pm S.H. ve medyan (<i>m</i>) olarak ifade edildi	37
Çizelge 4.3. NP ve EE'ye maruz bırakılan inci kefalinde CYP1A enziminin hepatositlerdeki immunohistokimyasal değerlendirilmesi	61
Çizelge 4.4. NP ve EE'ye maruz bırakılan dişi ve erkek inci kefalinde plazma 17β -östradiol seviyeleri. Değerler Ort. \pm S.H. olarak ifade edildi	66
Çizelge 4.5. NP ve EE uygulanan grupta dişi bireylerin plazma total T ölçümü sonucunda elde edilen veriler	68
Çizelge 4.6. EE ve NP uygulanan grupta erkek bireylerin plazma total T ölçümü sonucunda elde edilen veriler	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
%	Yüzde
♂	Erkek
♀	Dişi
cm	Santimetre
dk	Dakika
dl	Desilitre
g	Gram
g	Gravite
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
°C	Santigrad derece
pg	Pikogram
rpm	Devir sayısı/dakika

Kısaltmalar

BSA	Bovin Serum Albumin
-----	---------------------

β NF	Beta Naftoflavon
11-KT	11-Ketotestosteron
A	Androstenedion
AO	Atretik Oosit
AHH	Aril Hidrokarbon Hidroksilaz
ANOVA	Varyans Analizi
BaP	Benzo[a]piren
CYP1A	Sitokrom P4501A
DAB	Diaminobenzidin
DES	Dietilstilbestrol
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilendiamintetraasedik asit
EGTA	Etilenglikoltetraasedik asit
EE	Etinilestradiol
EROD	7-etoksiresorufin <i>O</i> -deetilaz
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
GC/MS	Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrofotometresi
GSI	Gonadosomatik İndeks
HAH	Halojenli Aromatik Hidrokarbonlar
HPLC/MS	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi/ Kütle Spektrofotometresi
<i>m</i>	Medyan
MV	Merkezi Ven
MS 222	Methanesulfonate Tuzu
NP	Nonilfenol
OP	Oktilfenol
Ort.	Ortalama
PAH	Poliaromatik Hidrokarbonlar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCB	Poliklorlu Bifeniller

PI	Propidium İyodür
BD	Büyük Damar
s.	Saniye
S	Stromal Doku
S.S.	Standart Sapma
S.H.	Standart Hata
T	Testosteron
TBS	Tris Tamponlu Salin
TdT	Terminal deoksinükleotidil Transferaz
TUNEL	Terminal Transferase Mediated dUTP Nick End Labelling

1. GİRİŞ

Endokrin sistemi bozucu kimyasallar, vücuttaki doğal hormonların sentezini, salgılanmasını, taşınmasını, metabolizmasını, bağlanmasını, etkisini ve katabolizmasını etkileyebilen dış çevresel moleküllerdir. Bunlar, insan ve hayvanların endokrin sistemi ile etkileşebilir ve çok düşük miktarlarda bile etkili olabilirler. Endokrin bozucular insanlarda ve yaban hayatında gelişimsel fonksiyon üzerine pek çok olumsuz etkiye sahiptir. Özellikle sinir ve ürogenital sistem gelişiminin kritik dönemleri ve erken postnatal yaşam süreci hormonal bozuluma duyarlıdır. Diğer taraftan ergin bireylerde, hormon bağımlı bezlerin çoğu (hipofiz bezi, hipotalamus, üreme organları), endokrin bozucuların hedefleridir. Bu etkiler muhtemelen hücre dönüşümü ve kanser ile sonuçlanabilir. Günümüzde endokrin bozucu olarak 60 civarında kimyasal tanımlanmış olup bunlar temel olarak üç grup altında toplanmıştır. Bunlardan birincisi; endüstri, ziraat ve tüketici ürünlerinde kullanılan sentetik bileşikler, ikincisi; farmasötik ilaçlar olarak kullanılan sentetik moleküller, üçüncüsü ise insan ve hayvan yiyeceklerinde bulunan doğal kimyasallardır (fitoöstrojenler). Bu kimyasalların yarılanma ömürlerinin uzun olmasından dolayı, çevrede küresel konsantrasyonlarındaki artış devam etmektedir. Bununla birlikte, üretildikleri, kullanıldıkları ve salındıkları yerden çok uzak mesafelerde bile belirlenebilmekte ve yoğunlaşabilmektedirler. Suda düşük, lipitte yüksek çözünürlüklerinden dolayı, yağ dokuda birikirler. İnsanlar ve hayvanlar, bu kimyasallar ile kontamine olan içme suyu, hava ve yiyecekler aracılığı ile maruz kalabilirler (Brevini ve ark., 2005). Bu maddeler, hücre içindeki endojen hormon reseptörlerine agonistik veya antagonistik etkili olabilir. Böylece hem doğal bir hormon etkisi oluştururlar hem de bu hormonların sentezi için gerekli enzim ekspresyonu ve aktivitesinde değişime neden olurlar. Bu şekilde, dolaşımda steroid hormon seviyelerinin değişimine yol açarlar. Bunun sonucunda da endokrin bozulmuş ve üreme sistemi fonksiyon bozukluklarına neden olurlar (Gray Jr. ve ark., 1998; Lintelman ve ark., 2003; Foster ve ark., 2004). Bu etkiler molusklarda imposeks (erkek cinsiyet karakteri gösteren ve üreme yeteneğini kaybeden dişi birey) olarak, timsah ve kuşlarda maskulinizasyon (erkekleşme) ve feminizasyon, Florida panterleri ve bazı memelilerde de fertilitate bozukluğu olarak ortaya çıkmıştır (Harrison ve ark., 1997).

Balıklarda endokrin bozucu kimyasallara maruz kalma, üreme fizyolojilerinde ve morfolojilerinde değişime yol açar. Bu değişimler; interseks (aynı gonada hem testis hem de ovaryum dokusunun bulunması) (Jobling ve ark., 1998, 2002; Vigano ve ark., 2001; Kavanagh ve ark., 2004), steroid hormon seviyesinde değişim (Villeneuve ve ark., 2002; Labadie ve Budzinski, 2006), erkek balıkta dişiye spesifik vitellogenin (Sumpter ve Jobling, 1995; Jobling ve ark., 1998) ve zona radiata proteinlerinin üretilmesi, (Arukwe ve ark., 1997; Fossi ve ark., 2004; Knoebel ve ark., 2004) feminizasyon (Sole ve ark., 2003), spermatogenezin bozulması (Kinnberg ve Toft, 2003), testis gelişimi ve olgunlaşmasında gecikme (Hassanin ve ark., 2002) ve düşük sperm sayısı (Haubruge ve ark., 2000) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte bu kimyasallar, gonadlarda histopatoloji (Weber ve ark., 2003) ve organ toksisitesine neden olurlar. (Weber ve ark., 2003, 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda endokrin bozucu kimyasallar, sediment, yüzey suları ve göl gibi akuatik çevrelerde de belirlenmiştir (Bursch ve ark., 2004; Kannan ve ark., 2003). Atıksu arıtma tesislerine, büyük miktarda evsel ve endüstriyel atık suları katılır; fakat, atık suların arıtımı tam olarak yapılamaz. Dolayısıyla atık su arıtma tesisinden çıkan sular endokrin bozucu kimyasalların bir kokteylini oluşturur. (Desbrow ve ark., 1998; Ternes ve ark., 1999; Pickering ve Sumpter, 2003). Atıksu arıtma tesisi suyuna maruz bırakılan ve atık suyun deşarj olduğu nehir ve göllerde yaşayan balıklarda yukarıda sözü edilen pek çok anormallik gözlenmiştir (Jobling ve ark., 2002; Higashitani ve ark., 2003; Kavanagh ve ark., 2004; Hassanin ve ark., 2002; Diniz ve ark., 2005; Liney ve ark., 2005; Penaz ve ark., 2005; Fentress ve ark., 2006).

İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) Van gölü Havzası'nda yaşayan Cyprinidae (Sazangiller) familyasına ait endemik bir türdür. Balık yörede ucuz bir besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. İnci kefali ile ilgili yapılan son histolojik ve biyokimyasal gözlemler sonucunda, Van-Edremit körfezinden yakalanan dişi bireylerin % 43.3'ünde, erkek bireylerin ise %13'ünde gonad anomalileri gözlenmiştir (Ünal ve ark., 2007). Bu anomaliler dişi bireyler için oositlerde dejenerasyon, GSI ve 17 β estradiol seviyesinde düşüş ve folikül hücrelerinde artan apoptoz, erkek bireylerde ise sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, intersititiyal dokuda artış, düzensiz ve boş seminifer

tübül olarak belirlenmiştir. İnci kefalinde gonadlarda gözlenen bu olumsuzlukların farklı çevresel kirleticilerden kaynaklanabileceği üzerinde durulmuştur

Endokrin sistemi bozucu kimyasaların İnci kefali üzerindeki etkileri hakkında daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, endokrin bozucu kimyasallardan olan 17α -etinilestradiol (gebelik önleyici uygulamalarda kullanılan sentetik bir östrojen) ve nonilfenol (deterjan, plastik ve herbisitlerin üretiminde kullanılan, alkilfenol polietoksilatların indirgenme ürünü)'ün inci kefalinde meydana getirdiği toksik etkiler *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle araştırıldı. Bunun için birinci bölümde her iki kimyasalın üç farklı konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi ve erkek balıkların karaciğer ve gonadlarındaki apoptoz, gonad histopatolojisi, karaciğer dokusunda CYP1A enziminin immunohistokimyası ve plazma 17β -östradiol ve testosteron seviyelerindeki değişim ele alındı. İkinci bölümde ise 24 saat boyunca her iki kimyasalın üç farklı konsantrasyonlarının kültürdeki karaciğer hücreleri üzerine olan apoptotik etkileri araştırıldı.

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. EE, NP ve balıklar ile diğer bazı sucul canlılar üzerindeki olumsuz etkileri ile ilgili çalışmalar

İnsan yapımı birçok kimyasal, doğal hormonlar gibi davranarak, hayvanlarda endokrin bozucu etkilere neden olabilmektedir (Colborn ve ark., 1993). Bunlar arasında organoklorin pestisitler, poliklorlu bifeniller, alkilfenol etoksilatlar, sentetik farmasötikler gibi ziraatte, endüstride ve tıpta kullanılan kimyasallar sayılabilir. Bununla birlikte insan ve hayvan orijinli östradiol de aynı etkiye sahiptir (Brevini ve ark. 2005; Routledge ve ark., 1998). Bu kimyasallar arasında etinilestradiol (EE) ve nonilfenol (NP) göze çarpan kimyasallardandır (Desbrow ve ark., 1998; Kannan ve ark., 2003; Bursch ve ark., 2004; Vethaak ve ark., 2005). EE, kontraseptif ilaçların temel bileşeni olup güçlü bir sentetik östrojendir (Larsson ve ark., 1999). NP ise deterjanların yapımında noniyonik surfaktan olarak kullanılan alkilfenol etoksilatların bir indirgenme ürünü olup zayıf östrojenik bir etkiye sahiptir (Jobling ve Sumpter, 1993). Hem EE hem de NP arıtma suyunda, sedimentte ve akuatik çevrede belirlenmişlerdir (Ahel ve ark., 1994; Ternes ve ark., 1999; Kannan ve ark., 2003; Bursch ve ark., 2004).

Alkilfenolik kimyasallara ve EE'ye maruz bırakılan olgun erkek balıkta dişiye spesifik vitellogenin sententezinin meydana geldiği ve testis gelişiminin inhibe olduğu bildirilmiştir (Jobling ve ark., 1996). Nonilfenole maruz bırakılan erkek balıkta ise vitellogenin ve zona radiata proteinlerinin, gen ifadesinin de uyarıldığı belirlenmiştir (Knoebel ve ark., 2004).

Endokrin sistemi etkileyerek üreme ve gelişmeyi engelleyebilme yeteneğindeki endokrin bozucular ve zenobiyotiklerin büyük oranda etkilediği akuatik ekosistemlerde yaşayan balıklar, bu kimyasallar için hedef organizmalardır ve toksikolojik patoloji *in vivo* çalışmalarda bu kimyasalların türler arasındaki zararlı etkileri hakkında bilgi sunan temel bir tekniktir (Wester ve ark., 2004).

Osaka'da NP, 17 β -östradiol ve bisfenol a konsantrasyonlarının, Wada nehrine göre 3-4 kat yüksek olduğu Ischizu nehrinde yaşayan *Cyprinus carpio*'da,

gonadosomatik indeksin (GSI) kontrol balıklarına ve Wada nehrinde yaşayan balıklara kıyasla düşük olduğu, testis gelişiminin inhibe olduğu ve testis olgunlaşmasının geciktiği bildirilmiştir. Ancak, Wada nehrinde yaşayan balıklarda anormal histolojik yapının olmadığını belirtilmiştir (Hassanin ve ark., 2002).

EE'ye maruz bırakılan olgun *Danio rerio*'da, erkek bireylerde GSI'in düştüğü, spermatogenezin inhibe olduğu ve testis histolojisinde değişimin meydana geldiği, dişi bireylerde ise, GSI'nin doza bağımlı olarak düştüğü, atretik oosit sayının arttığı ve ovaryumda olgun vitellogenik oositlerin bulunmadığı bildirilmiştir. (Van Den Belt ve ark., 2002).

Yumurta açılımının 2 gün sonrasında 60 gün sonrasına kadar EE ve NP'ye maruz bırakılan *Danio rerio*'da dişi ve erkek bireylerde gametogenezin konsantrasyona bağımlı olarak baskılandığı bildirilmiştir. Bununla birlikte NP ve EE'ye maruz bırakılan dişi bireylerde ovaryumda histopatolojik bir değişimin gözlenmemesine karşın testiste fibrozis, spermatogonya ve spermatozoidlerde piknozis ve asellularite artışı gibi histopatolojik değişimlerin meydana geldiği rapor edilmiştir. NP'nin 100 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakıldıktan sonra yumurta açılımının 60 gün sonrasında 300 gün sonrasına kadar temiz suya alınan dişi bireylerde ovaryum folikül atrezisinin arttığı gözlenmiştir (Weber ve ark., 2003).

EE ve NP'ye 28 gün süreyle maruz bırakılan *Gobiocypris rarus*'ta, 25 ng/l EE'ye maruz kalan olgun dişi bireylerde ovaryumlarda dejenerasyonun meydana geldiği gözlenmiştir. EE'nin 5, 25 ng/l konsantrasyonlarına ve 30 µg/l NP'ye maruz bırakılan olgun erkek bireylerde ise testiste spermin belirlenmediği, ovotestis oluşumunun gözlendiği ve karaciğerde hepatositlerde hipertrofi, hücresel yapılarda hasar ve eozinofilik materyal birikiminin meydana geldiği bildirilmiştir (Zha ve ark., 2007).

Yedi yıl boyunca 5-6 ng/l EE'ye maruz bırakılan balıklarda, erkek bireylerde testiste spermatogenezde gecikme, fibrozis, tübül malformasyonlarının ve interseksin meydana geldiği, dişi bireylerde ise oosit olgunlaşmasında gecikme ve atretik oositli ovaryuma sahip dişi bireylerin sayısında artışın olduğu belirlenmiştir (Kidd ve ark., 2007).

Üç yıl süresince 4,5-8,1 ng/l EE'ye maruz bırakılan *Margariscus margarita*'da ovaryumlarda ödem oluştuğu, testis dokusu gelişiminin inhibe olduğu ve interseks gözlemlendiği bildirilmiştir (Palace ve ark., 2006).

NP'nin 1 ve 10 µg/l konsantrasyonlarına aralıklı olarak maruz bırakılan cinsel olarak olgunluğa ulaşmış *Oncorhynchus mykiss*'te, östrojenik ve transjenerasyonel etkilerin incelendiği çalışmada, olgun erkek bireylerde vitellogenin seviyesinde yükselme ve yumurtadan çıkan birey sayısında düşme gözlemlenmiştir. (Schwaiger ve ark., 2002). NP'ye maruz olgun erkek bireylerde testis dokusunda histolojik olarak morfolojik farklılıkların meydana gelmediği F₁ neslindeki erkek bireylerde, vitellogenin seviyesinin değişmediği ancak dişi bireylerde vitellogenin seviyesinin yükseldiği, dişi ve erkek bireylerde interseks oluşumunun meydana geldiği bildirilmiştir. F₁ neslinde erkek bireylerde 17β-östradiol seviyesinin 2 kat yükseldiği, dişi bireylerde ise testosteron seviyesinin 13 kat arttığı ifade edilmiştir.

NP'ye 21 gün süre ile maruz bırakılan *Puntitus conchonus*'ta testis ve ovaryum somatik indekslerinin doza bağımlı olarak önemli bir şekilde düştüğü, histopatolojik olarak testiste sertoli hücrelerinde hipertrofi ve germinal hücre kaybı, ovaryumda ise yumurta gelişiminde gerileme ve atretik foliküllerde artış meydana geldiği bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2007).

Arslan ve Parlak, (2007), NP'nin artan konsantrasyonlarının *Arbacia lixula* embriyoları üzerine olan embriyotoksik etkilerini incelemiştir. Araştırmacılar, NP'nin düşük konsantrasyonlarda embriyoların iskelet sisteminde malformasyonlara neden olduğunu, yüksek konsantrasyonlarda ise mitozu engelleyerek gelişimi inhibe ettiğini belirlemiştir.

Paracentrotus lividus'un sperm ve yumurtalarına, NP ve OP'nin artan konsantrasyonlarını uygulayan Arslan ve ark., (2007), NP ve OP'nin üremeyi ve embriyonik gelişim safhalarını olumsuz etkilediğini ifade etmişlerdir.

2.2. EE ve NP'nin plazma steroid seviyeleri üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmalar

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çevrede bulunan endokrin bozucu kimyasalların dişi ve erkek balıklarda steroid seviyelerinde değişime yol açtığı gözlenmiştir. Folmar ve ark., (1996) atık su arıtma suyu ve zirai atık suyu ile kirlenen nehirlerde yaşayan erkek *Cyprinus carpio*'da, plazma testosteron seviyesinin önemli şekilde düştüğünü gözlemlemiştirler. Folmar ve ark., (2000), bir başka çalışmalarında ise Misisipi nehrinin atık su arıtma suyu ile kirlenen bölgesinde yaşayan *Stizostedion vireum*'da, referans bölgesinde yaşayan bireylere göre, erkek bireylerde testosteron seviyesinin düştüğünü, 17 β -östradiol seviyesinin yükseldiğini ve vitellogenin seviyesinin ölçülebilir düzeylere ulaştığını, bu bölgede yaşayan dişi bireylerde ise 17 β -östradiol konsantrasyonunun beş kat yükseldiğini ve testosteron seviyesinin düştüğünü bildirmişlerdir.

Gong ve Han, (2006), NP'nin 125 mg/kg/gün ve 250 mg/kg/gün dozlarına 50 gün süre ile maruz bırakılan sığanda testosteron seviyesinin önemli şekilde düştüğünü bildirmişlerdir.

Arukwe ve ark., (1997), NP'ye maruz bırakılan juvenil *Salmo salar*'da plazma 17 β -östradiol seviyesinin %24 ile %48 arasında düştüğünü bildirmişlerdir.

Labadie ve Budzinski, (2006), 3.5 ve 75 ng/l EE'ye 15 gün süreyle maruz bıraktıkları juvenil *Psetta maxima*'da EE'nin cinsiyet steroidleri üzerine olan etkisini incelemiştirler. EE'ye maruz kalan erkek bireylerde androstenedion (A) ve 11-ketotestosterone (11-KT) seviyelerinin plazma ve testiste belirlenemediğini, testosteron (T) seviyesinde düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada erkek bireylerde testis östrojen sentezinin ve konjugasyonunun yükseldiğini ve plazmada 17 β -östradiol seviyesinin belirlenemediği belirtilmiştir. Erkek bireylerde testis ve plazmada androjen/östrojen oranının düştüğü ve dişi bireylerde gözlenen değerlere yaklaştığı ifade edilmiştir. Dişi bireylerde ise EE'ye maruz kalma sonucunda ovaryumda testosteron seviyesinin belirlenemediği ve plazma 17 β -östradiol seviyesinin yükseldiği belirlenmiştir. Araştırmacılar, EE'nin düşük konsantrasyonda bile erkek bireylerde testiste androjen üretimini ve plazma androjen seviyelerinin düşürdüğünü ifade ederek EE'nin

steroid seviyeri üzerine olan etkisinin cinsiyete bağımlı olduğunu ve erkek bireylerin dişi bireylerden daha hassas olduğunu bildirmişlerdir.

Labadie ve Budzinski, (2006), 29 µg/l NP'ye maruz bıraktıkları juvenil erkek *Psetta maxima*'da plazma T, androstenedion ve 11-KT seviyelerinin azaldığını ancak dişi bireylerde T seviyesinin değişmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, erkek ve dişi bireylerde, plazma 17β-östradiol seviyelerinin NP'den etkilenmediğini gözlemlemişlerdir. NP'nin erkek bireylerde testis ve plazmada anrojen/östrojen oranını düşürdüğünü belirterek erkek bireylerin, NP'ye, dişi bireylerden daha hassas olduklarını ifade etmişlerdir.

Martin-Skilton ve ark., (2006), 30 ppb NP'ye maruz bırakılan juvenil *Gadus morhua* ve *Scophthalmus maximus*'ta steroid sentezinde rol oynayan enzim aktivitelerindeki ve plazma T ve 17β-östradiol seviyelerindeki değişimi araştırmışlardır. Çalışmada, juvenil *Scophthalmus maximus*'ta plazma T ve 17β-östradiol seviyelerinin önemli şekilde düştüğünü, ancak bunun cinsiyete bağlı olmadığını bildirmişlerdir. NP'ye maruz bırakılan juvenil *Gadus morhua*'da ise T ve 17β-östradiol seviyelerinin önemli bir değişim göstermediğini gözlemlemişlerdir. Juvenil *Scophthalmus maximus*'ta ovaryumda p450 aromataz aktivitesinin düştüğünü ancak androstenedionun testosterona dönüşümünde rol oynayan 17β-hidroksi dehidrogeaz aktivitesinde önemli bir değişimin olmadığını bildirmişlerdir.

Intraperitoneal olarak (1mg/kg) EE, estron, ve östradiol-17-β-glukuronide maruz bırakılan erkek kanal kedibalığında serum 17β-östradiol seviyesinin önemli şekilde yükseldiği gözlenmiştir (Tilton ve ark., 2001).

Giesy ve ark., (2000), NP'ye maruz bırakılan *Pimephales promelas*'ta plazma 17β-östradiol seviyelerinin erkek ve dişi bireylerde yükseldiğini bildirmişlerdir.

Yirmisekiz-otuzbir gün boyunca NP'nin 0,05-5,4 µg/l konsantrasyonlarına maruz bırakılan olgun *Cyprinus carpio*'da, plazma 17β-östradiol ve T seviyelerinde önemli bir değişimin meydana gelmediği bildirilmiştir (Villeneuve ve ark., 2002).

Nonilfenol etoksilatın 0,21- 7,9 µg/l arasındaki konsantrasyonlarına 42 gün boyunca maruz bırakılan *Pimephales promelas*'ta, plazma 17β-östradiol ve T

konsantrasyonlarının hem erkek hem de dişi bireylerde önemli bir değişim göstermediği bildirilmiştir (Nichols ve ark., 2001).

2.3. Apoptoz, çevresel kirleticilerin apoptoza olan etkileri ile ilgili çalışmalar

Canlılarda hücre ölümü iki yolla gerçekleşir; apoptoz ve nekroz. Apoptoz, embriyonik morfogenez, metamorfoz ve hormon uyarımlı dokuların şekillenmesi gibi temel biyolojik olaylarda rol oynayan hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoza giden hücrelerde en erken değişim, hücrenin komşu hücrelerle bağlantısı ve mikrovillus gibi plazma membranı yapılarının ortadan kalkmasıdır. Apoptozun başlangıç aşamasında, sitoplazmik hacmin küçülmesi ve sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşmasından dolayı hücre büzülür ancak hücre zarı bütünlüğünü korur. Kromatin, nukleus periferine kondanse olur ve kısımlara ayrılır. Sitoplazmik hacmin azalması iyon ve sıvı kaybına yol açar bunun sonucu olarak endoplazmik retikulum dilatasyona uğrar ve plazma membranıyla birleşen veziküllere bölünür. Bu olaylar sırasında bir çok organel ve mitokondri canlılığını korur daha sonraki aşamada plazma membranında blebler oluşur ve hücre kısımlara bölünür. Apoptotik cisimler adı verilen bu kısımlar, organelleri, nukleus kısımlarını ve hücre artıklarını içeren paketlerdir. Apoptozun son aşamasında, apoptotik cisimler, kendilerine komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptoz, nekrotik ölüme olduğu gibi tamamen patolojik nedenlerle meydana gelmez. Nekroz grup ya da küme halindeki hücreleri etkilediği halde apoptoz hücreleri, tek tek ve asenkronize bir tarzda etkiler. Apoptozda intrasellular makromoleküller hücre dışına sızmaz dolayısıyla nekrozda olduğu gibi enflamasyon meydana gelmez. Nekrozda RNA ve protein seviyesinde hızlı düşüşler meydana gelir bunun aksine apoptoz aktif bir “hücre sel intihar” sürecidir. Bu süreç normal ATP seviyesine sahip hücrelerde meydana gelir ve genellikle mRNA ve protein sentezine ihtiyaç duyar (Schwartzman ve Cidlowski, 1993).

Apoptozun en karakteristik biyokimyasal özelliklerinden biri de Ca^{++}/Mg^{++} bağımlı endonükleaz aktivitesi sonucunda DNA'nın internükleozomal bölgelerden düzenli olarak kesilerek 180-200 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentlerinin

oluşmasıdır. Bu fragmentler agaroz jel elektroforezde ayrıldıktan sonra “merdiven” modelinde gözlenebilir (Wyllie, 1980).

Endonukleaz aktivitesi ile oluşan kırık DNA'nın, 3'-OH uçlarının terminal transferaz enzimi ile işaretlenmesi ve işaretli bölgelerin biyotin avidin peroksidaz tekniği ile sinyallenmesi (Terminal Transferase Mediated dUTP Nick End Labelling, TUNEL) apoptotik hücrelerin histolojik kesitlerde tek hücre seviyesinde ve ışık mikroskobu ile incelenmesine olanak verir (Gavrieli ve ark., 1992).

Apoptozun belirlenmesinde TUNEL, anneksin V ve lamin B metodları karşılaştırıldığında, TUNEL ve anneksin V metodlarının duyarlı ve spesifik metodlar olduğu gözlenmiştir (Kylarová ve ark., 2002).

Filogenetik olarak korunmuş olan bu hücresel ölüm yolu, hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasından da sorumlu bir mekanizmadır (Wang, 2001).

Memelilerde yapılan çalışmalarda apoptozun, ovaryumda folikül gelişiminde (Tilly, 1996; Hussein, 2005), lüteolizis ve atrezide (Tilly ve ark., 1991; Hughes ve Gorospe, 1991; Palumbo ve Yeh, 1994) rolünün olduğu ve testiste spermatogenezis sırasında meydana geldiği (Bartke, 1995; Rodriguez ve ark., 1997) bildirilmiştir.

Üreme organlarının normal gelişiminde rolü olan bu mekanizma, memelilerde hem dişi hem de erkek üreme organlarında toksik ajanlar tarafından uyarılabilmektedir (Tilly, 1998; Moffit ve ark., 2007).

Petrokimyasal kontaminasyonun olduğu karasal ekosistemlerde yaşayan yabancı pamuk sıçanlarında ovaryumda apoptotik hücre ölümünün arttığı bildirilmiştir (Savabieasfahani ve ark., 1999).

Karbendazim ve mono-(2-etilhegzil)ftalat'a maruz bırakılan erkek sıçanlarda germ hücrelerinde doza bağımlı olarak apoptozun arttığı gözlenmiştir (Moffit ve ark., 2007).

Teleostlarda apoptozun, ovaryum gelişimi ve postovulasyon gerilemesinde rol oynadığı ancak folikül atrezisinde, memelilerde olduğu gibi, erken bir olay olarak ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Wood ve Van Der Kraak, 2001).

Drummond ve ark. (2000), *Astyanax bimaculatus lacustris*'in postovulasyon foliküllerinde folikül hücrelerinin ortadan kaldırılmasından sorumlu temel mekanizmanın, apoptoz olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kaptaner ve Ünal (2006), inci kefalinde de postovulasyon folikül gerilemesinde apoptotik hücre ölümünün meydana geldiğini TUNEL metodu ile belirlemiştir.

Uchida ve ark., (2002) juvenil hermafroditizmin meydana geldiği zebra balığında, testis ve ovaryum farklılaşmasının oosit apoptozu ile uyarıldığını belirterek, apoptozun zebra balığında cinsiyet farklılaşmasındaki rolünü ortaya koymuşlardır.

Prisco ve ark., (2003), apoptozun *Torpedo marmorata*'da spermatogenezin düzenlenmesinde temel bir süreç olduğunu ve testis homeostazisinde rol oynadığını bildirmişlerdir.

Corriero ve ark., (2007), *Xiphias gladius*'ta aktif spermatogenik fazda (Mayıs), sperm bırakma fazında (Haziran-Temmuz) ve sperm bırakılmasından sonraki fazda (Ağustos-Eylül) germ hücrelerindeki çoğalma aktivitesini, germ hücre apoptozunu ve plazma T ve 11-KT seviyelerini incelemiştir. Germ hücrelerindeki çoğalmanın Mayıs'ta arttığını, Haziran-Temmuz aylarında azaldığını ve Ağustos-Eylül aylarında stabil kaldığını, apoptozun esas olarak primer spermatositlerde ve tip B spermatogonyumlarda gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, germinal kist başına düşen ortalama apoptotik hücre sayısının Mayıs'ta en yüksek olduğu, Haziran ve Temmuz aylarında azaldığı ve Ağustos ve Eylül aylarında stabil kaldığı ifade edilmiştir. Plazma 11-KT seviyelerinin de T seviyelerinden daha yüksek olduğunu, 11-KT seviyelerinin, germ hücrelerindeki maksimum çoğalma ve apoptoz ile orantılı olduğunu bildirmişlerdir.

Gametogenez sırasında apoptotik hücre ölümü diploid ve triploid erkek *Scophthamus maximus*'ta da gözlenmiştir (Terrones ve ark., 2003).

Chavez-Pozo ve ark., (2005), *Sparus aurata*'da spermatogonyal kök hücrelerinin, sertoli hücrelerinin ve primer spermatogonyumların üreme periyoduna bağımlı olarak çoğaldığını ve apoptozun sperm bırakıldıktan sonraki periyotta primer spermatogonyumlarda meydana geldiğini gözlemlemiştir.

Apoptoz, zenobiyotik stresine, hücresel fonksiyon ve yapı kaybına ve organizmanın sağlığına ilişkin mekanistik bilgi sunan duyarlı ve faydalı bir biyomarkırdır (Sweet ve ark., 1999).

Piechotta ve ark., (1999), üç farklı zenobiyotiğin *Limanda limanda* karaciğerinde apoptotik hücre ölümüne olan etkisini incelemişler ve bunlardan kadmiyum ve PCB 118'in apoptotik DNA fragmentasyonu artırdığını, PCB 77'nin ise

apoptotik ölümden ziyade nekrotik ölüme yol açtığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, apoptozun, akuatik çevredeki biyolojik etki izleme çalışmaları için duyarlı bir biyomarkır olabileceğini ifade etmişlerdir.

Janz ve ark., (1997), beyazlatılmış kağıt hamuru fabrikası atık suyuna maruz kalan dişi *Catostomus commersoni*'da, apoptozun ovaryum folikül hücrelerinde referans bölgesinden örneklenen bireylere kıyasla on kat arttığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte artan ovaryum folikül hücre apoptozuyla ilişkili olarak, ovaryum boyutunun küçüldüğünü, plazma testosteron konsantrasyonunun %25 oranda düştüğü ve plazma 17β -östradiol seviyesinin iki kat yükseldiği ifade etmişlerdir.

β -naftoflavona ve poliaromatikhidrokarbon dimetilbez[a]antrasen'e intraperitoneal olarak maruz bırakılan juvenil *Ictalurus punctatus*'un ovaryumunda apoptozun arttığı belirlenmiştir (Weber ve Janz, 2001).

Çevresel östrojenler olan NP, oktilfenol (OP) ve doğal östrojen 17β -östradiole erken gastrula evresinde 10 nM ve 10 μ M aralığındaki çeşitli konsantrasyonlarda maruz bırakılan *Xenopus laevis*'te, mortalitede, morfolojik değişimlerde ve apoptozda artışın olduğu bildirilmiştir (Bevan ve ark., 2003).

Östrojenik NP'nin 100 ppb konsantrasyonunda olgun erkek *Oryzias latipes*'te spermatozoidlerde, sertoli hücrelerinde ve leydig-homolog hücrelerinde apoptozun altı kat arttığı ancak spermatidlerde apoptotik ölümün meydana gelmediği, karaciğer, böbrek ve bağırsakta gözlenen apoptozun da önemsiz olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, androjenik kuersetine maruz bırakılan olgun dişi *Oryzias latipes*'te ise atretik ovaryum folikül sayısında anlamlı biçimde artışın olduğu ve karaciğer, böbrek ve barsakta gözlenen apoptozda önemli bir değişimin olmadığı belirtilmiştir (Weber ve ark., 2002).

Yumurta açılımından cinsel olgunluğa ulaşıncaya dek altı ay süreyle EE'ye (10 ng /l) maruz bırakılan *Oryzias latipes*'te erkek ve dişi bireylerde TUNEL pozitif hepatosit ve böbrek tübül hücrelerinin arttığı, erkek bireylerde testis hücre apoptozunda artış olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, testiste interseks ve fibrozise sahip bireylerde TUNEL boyanmanın meydana gelmediği belirlenmiştir. EE'nin dişi bireylerde TUNEL pozitif ovaryum somatik hücre sayısı ve ovaryum folikül atrezisi üzerine etkili olmadığı ifade edilmiştir. Buna göre EE'nin her iki cinsiyette de

hepatotoksik ve nefrotoksik olduğu ancak gonadal toksisitenin sadece erkek bireylere spesifik olduğu bildirilmiştir (Weber ve ark., 2004).

Metilcivaya maruz bırakılan *Pimephales promelas*'ta primer ve kortikal alveolar safhadaki ovaryum foliküllerinde apoptotik folikül hücre sayısının önemli bir şekilde arttığı ve 17 β -östradiol konsantrasyonunun baskılandığı bildirilmiştir (Drevnick ve ark., 2006).

Serumsuz ortamda NP'ye 0, 0.01, 0.1, 1 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda maruz bırakılan fenokromositoma PC12 hücrelerinde, agaroz DNA merdiven modelinin ve TUNEL metodu ile kantifiye edilen DNA parçalanmasının 0.01 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda arttığı ancak serum içeren ortamda NP'nin aynı konsantrasyonlarına maruz bırakılan PC12 hücrelerinde DNA parçalanmasının seyrek olduğu ifade edilmiştir (Aoki ve ark., 2004).

Kim ve ark., (2006), NP ve OP'nin farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerinde ve insan embriyonik kök hücrelerinden türevlenen nöral progenitör hücrelerinde apoptozu uyardığını, özellikle kök hücre türevi nöral progenitör hücrelerin bu toksikantlara farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerinden daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte toksik stres yanıtının gelişimsel safhaya bağılı olarak farklılık gösterebileceğini ifade etmişlerdir.

NP'ye 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 2, 4 ve 6 saat boyunca maruz bırakılan timositlerde, apoptozun 4. ve 6. saatlerde önemli olarak yükseldiğı belirlenmiştir (Yao ve ark., 2006).

Yao ve ark., 2007, NP'ye 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda 12 ve 24 saat boyunca maruz bıraktıkları, jurkat hücrelerinde internükleozomal DNA parçalanmasının arttığını bildirmişlerdir.

2.4. CYP1A

Sitokrom P450 bağımlı monooksijenaz enzimleri (CYPs) yapısal ve fonksiyonel olarak hem proteinleri ile ilişkili olan bir familyayı kapsar. Sitokrom P450 (CYP) sisteminin temel fonksiyonu poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), poliklorlu bifeniller

(PCB), dioksinler, halojenli aromatik hidrokarbonlar (HAH) gibi eksojen kimyasalların yanı sıra ilaçlar, steroidler, nörohormonlar, yağ asitleri ve prostaglandinler gibi endojen bileşiklerden oluşan çok geniş bir substrat aralığının oksitativ metabolizasyonudur. Biyotransformasyon basamağının genellikle birincisini oluşturan bu oksitativ süreç terminolojide 'faz I' metabolizması olarak adlandırılır. Sitokrom P4501A (CYP1A) alt ailesi yukarıda sözü edilen bir çok yabancı maddenin biyotransformasyonunda rol oynamasından dolayı daha fazla dikkat çekmektedir. Memeli ve teleost CYP1A formlarının karakteristik özelliği zenobiyotikler tarafından uyarılabilmesidir. Uyarıcıya yanıt sitosolik ligand aktiviye transkripsiyon faktörü olarak bilinen aril-hidrokarbon (Ah) reseptörü aracılığıyla gerçekleştirilir. Ligand olarak zenobiyotiğin reseptöre bağlanması ile ısı şok proteini 90'nın ayrıldığı transformasyon süreci, daha sonra ise Ah reseptörü-ligand altbirimi ve Ah reseptör nükleer translokator proteini (ARNT) arasında heterodimer oluşum süreci meydana gelir. Transkripsiyonel olarak aktif olan heterodimer, DNA üzerinde CYP1A geninin promotor bölgesinin yanındaki spesifik Ah reseptör-yanıt elementleri (AHRE) ile etkileşmek üzere nukleusa geçer. Etkileşim, CYP1A gen transkripsiyonu, mRNA sentezi, protein sentezi ve son olarak katalitik aktivitesi ile sonuçlanır (Sarasquete ve Segner, 2000).

Zenobiyotiklere maruz kalma sonucunda CYP1A'nın uyarılabilirliği, akuatik çevredeki kirlilik izleme çalışmalarında bir biyomarkır olarak kullanımını ortaya çıkarmıştır (Goksöyr ve Förlin, 1992; Stegeman ve Hahn 1994). CYP1A ile yapılan sitotoksikolojik ve ekotoksikolojik çalışmalar, enzimin katalitik aktivitesi (7-etoksiresorufin *O*-deetilaz (EROD), aril hidrokarbon hidroksilaz (AHH) vb.)), gen ve protein ekspresyonu ve dokulardaki immunohistokimyasal lokalizasyonu gibi farklı yöntemlere dayanmaktadır (Goksöyr ve Förlin, 1992; Sarasquete ve Segner, 2000; Fent, 2001; Mortensen ve ark., 2006).

Miller ve ark., (1988), β -naftoflavon enjekte edilerek uyarılan CYP-450E enziminin *Stenotomus chrysops* ve gökkuşuğu alabalığında (*Salmo gairdneri*), karaciğer, solungaç ve kalpteki immunohistokimyasal lokalizasyonunu incelemiştirlerdir. İki türde de karaciğerde enzimin hepatositlerin sitoplazmasında lokalize olduğunu, hepatosit alt popülasyonlarında CYP-450E'nin zonasyonunu gösteren bölgesel farklılıkların olmadığını, sinüzoid, venöz ve venüllerde endotelial hücrelerde aktivitenin

gözlenmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, enzimin başlıca hepatositlerde lokalize oluşunu, bu hücrelerin zenobiyotiklerin metabolizasyonundaki kritik rolünü desteklediğini belirtmişlerdir.

Smolovitz ve ark., (1989), Boston Liman'ının fazla miktarda kirlenen bölgelerinde yaşayan ve hepatik patoloji gösteren sahip *Pseudopleuronectes americanus*'ta karaciğer dokusunda CYP-450IA1 enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonunu belirlemişlerdir. Çalışmada, Boston Limanı'nda yaşayan balıklarda hepatositlerin vasküler kutuplarında intrasellular spesifik pozitif boyanma yoğunluğunun arttığını, safra epitel hücrelerinin değişken boyandığını ve endotelin boyanmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca, hepatik patolojinin gözlenmediği Vineyard Sound referans bölgesinde yaşayan *Pseudopleuronectes americanus*'un hepatositlerindeki peroksidaz boyanmasının başlıca komşu hücre membranlarına ve nukleus membranına bitişik bölgelerde meydana geldiğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar, CYP-450IA1 enziminin hücresel dağılımının, PAH ve hepatoksinlere sürekli ya da daha sonradan maruz kalma sonucunda farklı hücre tiplerinde metabolik heterojenite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Stegeman ve ark., (1991) klorlu bifeniller ve dibenzofuranlar ile kontamine olmuş çevreden örneklenen *Stenotomus chrysops*'un çeşitli organlarında CYP450IA1 enziminin varlığını ve lokalizasyonunu belirledikleri araştırmalarında, enzimin karaciğerde hepatik, pankreatik ve vasküler dokuda belirlendiğini, boyanmanın karaciğer hücrelerinde sitoplazmada az olduğu, plazma ve nukleus membranlarına yakın olan kısımlarda yoğun olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, enzim boyanmasının, böbrek ve bağırsakta epitelyal yapılarda ve vasküler endotel hücrelerinde belirgin olduğunu, kalp, solungaç, dalak, testis, ovaryum, burun ve beyinde ise sadece endotelyal hücrelerde meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmada bütün organlarda endotelyal hücrelerin CYP450IA1'nin uyarımı için önemli olduğunu belirterek immunohistokimyanın CYP450IA1 enziminin belirlenmesinde faydalı bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

PAH'a maruz bırakılan *Poeciliopsis monacha* ve *Poeciliopsis lucida*'da farklı hücre tiplerinde CYP1A enziminin immunohistokimyasal olarak uyarımının incelendiği bir çalışmada (Smolowitz ve ark., 1992), karaciğer ve bazı organlarda CYP1A

boyanmasının *P. monacha*'da, *P. lucida*'dan daha güçlü olduğu ve bunun tür farklılığı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Lester ve ark., (1993), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğerinde yapmış oldukları ince yapı çalışmasında CYP1A1 enziminin, hepatositlerde perinükleer bölgede granüllü endoplazmik retikulumda lokalize olduğunu bildirmişlerdir.

β -naftoflavon (β NF)'a maruz bırakılan *Gadus morhua*'da CYP1A enzimine ait spesifik boyanmanın hepatosit sitoplazmasında olduğu gösterilmiştir (Husøy ve ark., 1994).

Son yıllarda yapılan çalışmalar östrojenlerin ve zenoöstrojenlerin CYP1A enzimi ile etkileştiğini göstermektedir. Sıçan karaciğerinde NP'nin kompetitif olarak CYP1A aktivitesini inhibe ettiği ve CYP1A protein ifadesini azalttığı bildirilmiştir. (Lee ve ark., 1996).

NP'ye ve 17β -östradiol'e maruz bırakılan *Salmo salar*'da, hepatik EROD ve UDP-glukuronosiltransferaz aktivitesinde ve CYP1A protein seviyesinde azalmanın olduğu belirlenmiştir. (Arukwe ve ark., 1997).

Hasselberg ve ark., (2004), alkilfenol karışımına (C₄:C₅:C₆:C₇;1:1:1:1) ve 17β -östradiol'e maruz bırakılan *Gadus morhua*'da CYP1A protein ifadesinin, erkek bireylerde doza (0, 0.02, 2, 20, 40, 80 ppm) bağımlı olarak arttığını, dişi bireylerde ise alkilfenol karışımının ve 17β -östradiol'ün CYP1A protein ifadesine etkilerinin olmadığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, erkek bireylerde alkilfenol karışımının enzim aktivitesinde etkili olmadığı ve 17β -östradiol'ün ise enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Dişi bireylerde ise alkifenol karışımının ve 17β -östradiol'ün CYP1A aktivitesinde etkisiz oldukları ifade edilmiştir. Çalışmada, alkilfenol karışımının, *in vitro*'da CYP1A aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği ancak 17β -östradiol'ün aktiviteye etkisi olmadığı belirlenmiştir.

NP, Kuzey denizi petrolü ve her iki maddenin kombinasyonuna maruz bırakılan *Gadus morhua*'da, NP'nin CYP1A seviyesini ve EROD aktivitesini düşürdüğü aynı zamanda her iki maddenin kombinasyonuna maruz bırakılan grupta, yalnız Kuzey denizi petrolüne maruz bırakılan gruba kıyasla, CYP1A protein seviyesinin ve EROD aktivitesinin düştüğü belirlenmiştir (Sturve ve ark., 2006).

Navas ve Segner, (2001), gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) hepatositlerinde 17 β -östradiol'ün, bazal EROD aktivitesini ve CYP1A mRNA ifadesini düşürdüğünü gözlemlemişlerdir. Çalışmada, östrojen reseptör antagonisti olan tamoksifenin 17 β -östradiol'ün neden olduğu bazal EROD aktivitesindeki düşüşü durdurduğu bununla birlikte 17 β -östradiol'ün β NF ile uyarılan CYP1A mRNA ifadesi ve EROD aktivitesi üzerinde etkisiz olduğu bildirilmiştir.

Elskus, (2004), Benzo[a]piren (BaP)'e maruz bırakılan primer hepatositlerde, 17 β -östradiol'ün CYP1A ifadesine baskılayıcı etkisini göstermiştir.

EE enjekte edilen sazanda (*Cyprinus carpio*), karaciğer EROD aktivitesinin ve CYP1A proteinin azaldığı bildirilmiştir (Solé ve ark., 2000).

Mdegela ve ark., (2006), Benzo[a]piren (BaP)'e maruz bırakılan *Clarias gariepinus*'da, EE'nin CYP1A EROD aktivitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar EE, BaP ve her iki kimyasalın kombinasyonunun 0, 1, 3, 6 gün boyunca uygulamasından sonra solungaç ve karaciğerde maksimum EROD uyarımının 1. günde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmada, her iki kimyasalın uygulandığı grupta, solungaç filamentinde EROD uyarımının sadece BaP uygulanan gruba göre önemli derecede inhibe olduğu belirterek, EE'nin BaP'a antagonistik etkili olduğu ancak bu antagonistik etkinin karaciğerde meydana gelmediği belirtilmiştir.

2.5. İnci kefali ile ilgili çalışmalar

İnci kefali, 9.8 pH'ya sahip Van gölünde yaşayan endemik bir sazan türüdür. Bu balık Nisan ayının ortasında başlayan ve Temmuz ayının ortasına kadar devam eden üreme döneminde, yumurta ve sperm bırakmak için göle dökülen akarsulara göç eder (Danulat ve Selçuk, 1992).

İnci kefali bölgede besin kaynağı olarak kullanılan ve yıllık avlanma miktarı 11.000 tonun üzerinde olan (Anonim, 2008) ekonomik öneme sahip bir türdür.

İnci kefali populasyon yapısını, büyüme, beslenme, üreme özelliklerini ve avcılığını inceleyen Çetinkaya ve Öksüz (1996), balığın gölde ağırlıklı olarak zooplankton ve bentik fauna ile beslendiğini bildirmişlerdir.

Van gölü ve göle dökülen Karasu çayında inci kefalinin üreme özelliklerini araştıran Elp ve Çetinkaya, (2000), balığın üreme yaşının üç olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, GSI değerinin Ağustos ve Eylül aylarında en düşük seviyede olduğunu, Ekim ayından itibaren yükselmeye başladığını ve Mayıs ayında en yüksek değere ulaştığını ifade etmişlerdir.

Ünal ve ark., (1999), inci kefalinde yaşa ve cinsiyete bağlı gonad gelişim safhalarını histolojik olarak incelemişlerdir. Gonad gelişiminin dişi bireylerde kromatin-nukleolus, perinuklear, kortikal alveolar, vitellogenik, olgunlaşma ve ovulasyon olmak üzere altı safhadan meydana geldiğini belirlemişlerdir. Dişi bireylerde kromatin nukleolar safhanın bir yaşına kadar sürdüğü, perinuklear safhanın ise iki yaşına kadar devam ettiği bildirilmiştir. Kortikal alveolar safhanın, Haziran'dan Eylül'e kadar, vitellogenezisin Ekim'den Mart'a kadar, olgunlaşma safhasının Nisan-Mayıs arasında ve ovulasyonun Mayıs-Haziran aylarında gerçekleştiğini gözlemlemişlerdir. Dişi bireylerde ovulasyonun otuzaltı aylık ve daha yaşlı bireylerde gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Erkek bireylerde ise testis gelişiminin olgunlaşmamış (iki yaşa kadar), olgunlaşan (Haziran-Ocak) ve olgun (Ocak-Haziran) olmak üzere üç aşamadan meydana geldiğini belirlemişlerdir. Spermlerin otuzaltı aylık ve daha yaşlı bireylerce bırakıldığını belirtmişlerdir.

Ünal ve ark., (2007), inci kefalinde yaptıkları histolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda, Van gölünden yakalanan dişi bireylerin % 43.3'ünün, erkek bireylerin ise %13'ünün gonad anormalliklerine sahip olduğunu gözlemlemişlerdir. Dişi bireylerde gözlenen bu anormalliklerin oositlerde dejenerasyon, GSI ve 17 β -östradiol seviyesinde düşüş ve folikül hücrelerinde apoptoz, erkek bireylerde ise sertoli hücrelerinde vakuolizasyon, intersititiyel dokuda artış, düzensiz ve boş seminifer tübül olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir. Anormal gonada sahip balıklarda, karaciğerde asetil kolin esteraz aktivitesinin inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, inci kefalinde gözlenen bu olumsuzlukların farklı çevresel kirleticilerden veya diğer bilinmeyen faktörlerden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir

2.6. Çalışmanın amacı

İnci kefalinde endokrin bozucu kimyasalların *in vivo*'daki etkileri hakkında geçmişte yapılmış bir çalışmaya rastlanmadı ve bu kimyasalların inci kefalinde ne tür olumsuzluklar meydana getirdiği bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı EE ve NP'ye 32 gün, su yolu ile maruz bırakılan inci kefalinde **1)** Karaciğer ve gonadlarda meydana gelen toksik etkiyi apoptoz ile belirlemek **2)** Gonadlardaki histopatolojik etkilerini belirlemek **3)** Bu kimyasalların plazma steroid seviyelerinde değişime neden olup olmadığını belirlemek **4)** Karaciğerde CYP1A enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu kimyasalların *in vivo*'da yol açtıkları olumsuzların yanı sıra her iki kimyasalın üç farklı konsantrasyonunun 24 saatlik süre içinde kültüre alınan karaciğer hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini belirlemektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Balık temini

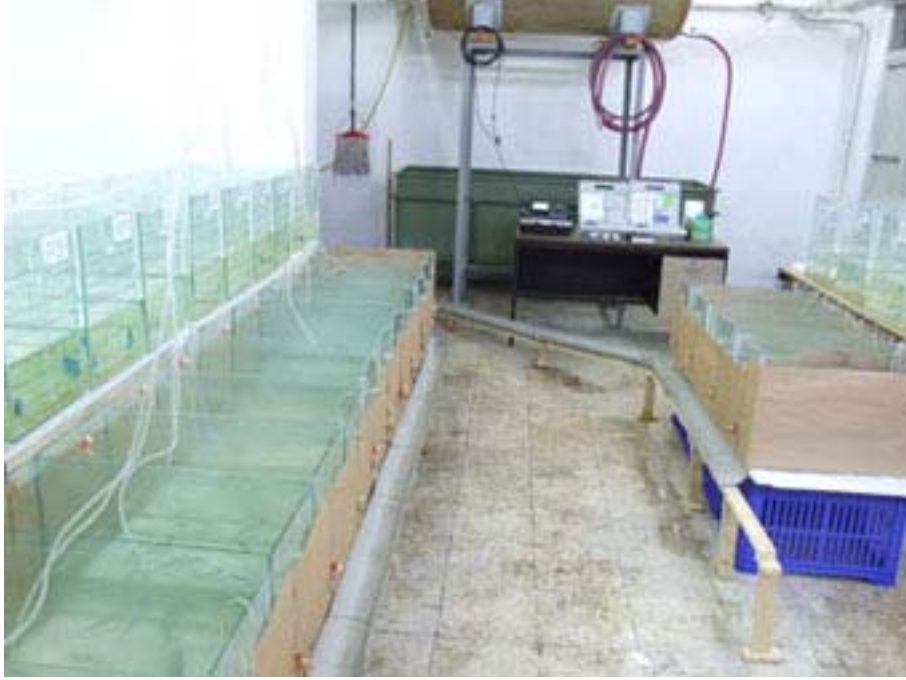
Çalışmada kullanılan inci kefalleri Van Gölü'ne dökülen Karasu çayından elektroşok ile yakalandı (şekil 3.1). Balıklar oksijen ile beslenen kaplar ile Su Ürünleri Bölümü Balık Tesislerine taşındı ve burada bulunan 1000 l hacimli, sürekli su akışının olduğu ve hava motorları ile havalandırılan fiberglas tanklara aktarıldı. Balıklar, su sıcaklığının ortalama 16 °C olduğu tankta, doğal fotoperyot altında bir ay aklimatizasyon peryoduna bırakıldı. Bu peryot boyunca balıklar ticari alabalık yemine alıştıırılarak yem almaları sağlandı. Aynı zamanda her gün tank suyu temizliği yapıldı.



şekil 3.1. Deney materyali inci kefallerin Karasu çayından yakalandığı andan bir görünüm.

3.2. Deneysel dizayn ve kimyasal uygulama

Bir aylık aklimatizasyon periyodundan sonra stok tankında bulunan balıklar, Su Ürünleri Bölümü'nde bulunan laboratuara getirilerek, 60 l su hacimli cam akvaryumlara her akvaryumda 10 balık olacak şekilde rastgele olarak dağıtıldı. Görsel stresi önlemek için akvaryumların etrafı kağıtla kapatıldı (Şekil 3.2). Çalışmada $9,72 \pm 0,70$ cm (Ort. \pm S.S.) çatal boylu ve $8,92 \pm 2,07$ g (Ort. \pm S.S.) vücut ağırlıklı balıklar kullanıldı (Şekil 3.3). Deney ortamına alınan balıklara, 5 gün sonra kimyasal uygulaması başlatıldı. 17α -Ethinilestradiol (EE, saflık: %98, Sigma, Kat. No: E4876) ve 4-*n*-Nonilfenol (NP, saflık: %99, Riedel-de Hæn, Kat. No: 46405)'lün stok solüsyonları aseton (HPLC derece, Sigma) solvent içinde hazırlandıktan sonra EE için 1, 10, 100 ng/l ve NP için 10, 60, 200 μ g/l nominal konsantrasyonlarda olacak şekilde akvaryum sularına manuel olarak eklendi. Akvaryum suyundaki aseton konsantrasyonu %0.001'den düşük olacak şekilde ayarlandı. Balıklar üzerine solventin etkisi hakkında bilgi edinmek için bir kontrol akvaryumuna ek olarak ikinci bir kontrol akvaryumuna, yalnızca aseton solvent eklendi. Balıklara kimyasal uygulaması semistatik yenileme sistemi ile 32 gün boyunca, 12:12 fotoperiyot altında yapıldı. Uygulanan test kimyasalları, akvaryum suyunun %80'inin değişimi ile 24 saatte bir yenilendi. Çalışma sekiz grup ile gerçekleştirildi ve her grup için bir tekerrür akvaryumu oluşturuldu. Çalışmada en az bir gün dinlendirilmiş şebeke suyu kullanıldı. Yemleme günde bir kez yapıldı ve yenilmeyen yemler ile balık atıkları günlük olarak temizlendi. Uygulama süreci boyunca akvaryumlarda su sıcaklığı (Ort. \pm S.S.: $14,08 \pm 0,8$ °C), pH (Ort. \pm S.S.: $8,78 \pm 0,1$), çözülmüş oksijen (Ort. \pm S.S.: $4,41 \pm 0,44$ mg/l) ve kondüktivite (Ort. \pm S.S.: $638,62 \pm 57,8$ μ MHOS/cm) gibi su kalitesi kriterleri her gün düzenli olarak ölçüldü. CaCO₃ cinsinden sertlik, dinlendirilmiş stok musluk suyu tankında çalışmanın başında ve sonunda olmak üzere iki kez ölçüldü. Bu değerlerin sırasıyla 198 ve 216 mg/ml olduğu belirlendi. Balıklara kimyasal uygulamasının yapıldığı deneme ortamı, Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. İnci kefaline EE ve NP uygulamasının yapıldığı deneme ortamından bir görünüm.



Şekil 3.3. Denemede kullanılan inci kefalinden bir örnek (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811).

3.3. Doku Alınması

Kimyasal uygulamasının tamamlanmasının ardından balıklar MS-222 (200mg/l, 3-aminobenzoik asit etil ester, Sigma) ile anestezi edildi. Balıklar disekte edilmeden önce her balık için çatal boy ölçümü ve total vücut ağırlığı tartımı yapıldı. Balıklardan kan örnekleri, 25 µl heparin ve 25 µl aprotinin (5-10 tripsin inhibitör

unit/ml, Sigma, A6279) içeren enjektör ile kaudal damardan alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj edilene kadar buz üzerinde saklandı. Kanı alınan balıklar disekte edilerek karaciğer ve gonadları çıkarıldı. Çabuk bir şekilde karaciğer ve gonad tartımı yapıldıktan sonra dokular, Bouin ve %10'luk nötral tamponlu formalin fiksatifleri ile tespit edildi ayrıca her balıktan yaş tayini için bir çift operkulum alınarak saklandı. Balıklardan alınan kan örnekleri ependorf tüplere aktarıldıktan sonra 2000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Plazmalar pipetlenerek farklı bir ependorf tüplere alındı. Elde edilen plazmalara aprotinin (4 µl aprotinin/100 µl plazma) eklendi ve analiz edilene kadar -76 °C'de saklandı.

3.4. Histoloji, cinsiyet belirlenmesi ve yaş tayini

Bouin fiksatif ile tespit edilen dokular, %70'lik etanol ve %10'luk nötral tamponlu formalin ile tespit edilen dokular ise, PBS (pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra, dereceli etanol (%70, %80, %96 ve absolu) serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldü. Cinsiyet tayini, her balığın gonadından alınan kesitlerin (5 µm), Hematoksilen eozin ve Mallory trikrom boyaları ile boyanmasıyla histolojik olarak yapıldı. Her balık için gonad gelişim safhası inci kefalinde Ünal ve ark., (1999)'nın belirlediği kriterlere uygun olarak tanımlandı. Yaş tayini operkular kemikler aracılığıyla belirlendi. Operkulumlar %4'lük NaOH ile temizlendikten sonra %96'lık etanolde şeffaflaştırıldı. Daha sonra yaş halkalarına dayanılarak tayin yapıldı.

3.5. TUNEL (Terminal transferase mediated dUTP nick end labelling)

Karaciğer, ovaryum ve testis dokularından alınan kesitlerde apoptotik DNA fragmentli hücrelerin (TUNEL pozitif) işaretlenmesi için TUNEL metodu kullanıldı. TUNEL boyaması, TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection ticari kitiyle (Kat. No: QIA33, Calbiochem, Merck, ABD) ve kit protokollerine uyularak yapıldı. Özetle, %10'luk nötral tamponlu formalin ile tespit edilen dokulara ait 4 µm kalınlığındaki

kesitler polilizin kaplı lamlara aktarılıp, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra, TBS (20 mM Tris pH: 7,6, 140 mM NaCl) ile yıkandı. Kesitler daha sonra, proteinaz K (10mM Tris'de, pH:8, 2 mg/ml) ile oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilerek dokunun permeabilizasyonu sağlandı. Lamlar TBS ile yıkandıktan sonra, metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek dokudaki endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirildi. TBS ile yıkamadan sonra, kesitler TdT tamponu (1 M Sodyum kakodilat, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA, 3.75 mM CoCl₂, pH: 6,6) ile oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Kesitler daha sonra, biyotin ile işaretlenmiş deoksiniükleotidler ve TdT enziminin karıştırılmasıyla (3 µl enzim, 57 µl TdT işaretleme karışımı) hazırlanan karışımla 37 °C'de nemli ortamda 90 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, doku kesitleri sonlandırma tamponu (0.5 M EDTA, pH:8) ile inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. TBS ile yıkamadan sonra kesitler, PBS ile hazırlanan %4'lük BSA ile 10 dk inkübe edildi. Lamlardan %4'lük BSA uzaklaştırıldıktan sonra, kesitler %4'lük BSA ile 1:50 oranında sulandırılan peroksidaz streptavidin konjugatı ile, nemli atmosferde, oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilerek, TBS ile yıkandı. Yıkamadan sonra kesitler, DAB (3,3'-diaminobenzidin) ile muamele edilerek, kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar beklendi. Lamlar distile suda yıkandıktan sonra, %0,3'lük metil yeşili ile zıt boyama yapıldı. Daha sonra etanol ve ksilol serilerinden geçirilip, entellan ile kapatıldı. Pozitif kontrol kesiti, Proteinaz K uygulamasından sonra, örneğin DNaz I (TBS ile hazırlanan 1mM MgSO₄'de 1µg/µl, Kat. No: A3778, AppliChem) enzimi ile oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonu ile yapıldı. Negatif kontrol kesitinde ise, işaretleme karışımına TdT enziminin yerine bidistile su konuldu. Diğer basamaklar her iki kontrol kesitlerinde de yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Preparatlar, mikroskopta (Nikon Eclipse E600) incelenerek görüntüleri alındı.

3.5.1. Apoptozun kantifikasyonu ve atretik oosit sayımı

Apoptoz kantifikasyonu, TUNEL metodu ile boyanan karaciğer, ovaryum ve testis dokusu kesitlerinde apoptotik (parçalı DNA'ya sahip) hücrelerin sayılması ile

yapıldı. Karaciğer dokusunda sayım, Weber ve ark., (2002)'ndan, testis dokusundaki sayım Young ve ark., (1999)'ndan ve ovaryum dokusundaki sayım Drevnick ve ark., (2006)'ndan modifiye edilerek gerçekleştirildi.

Karaciğer dokusunda, bir bireyden alınan bir kesitte birbiri ile kesişmeyen rastgele seçilmiş ve sabit bir alana ($750000 \mu\text{m}^2$) sahip en az üç gözlem alanının (karaciğer kesitinin büyüklüğüne göre 3 ile 6 arasındadır) 100X büyütmede çekilen görüntüleri Axiovision programına aktarıldıktan sonra sayım modülünden yararlanarak, her alanda apoptotik (TUNEL pozitif) hücre sayımı yapıldı. Daha sonra farklı alanlarda sayılan apoptotik hücrelerin ortalaması o birey için apoptotik karaciğer hücre sayısı olarak hesaplandı. Grup içinde her balığa ait ortalama değerler, istatistiksel değerlendirme için kullanıldı (örneğin, n sayısı farklı bir balığı temsil etmektedir).

Testis dokusunda apoptotik hücre sayımı, bir bireyden alınan bir kesitte seminifer tübüller içindeki apoptotik (TUNEL pozitif) germ hücreleri sayılarak yapıldı. Her birey için 100 seminifer tübülde apoptotik hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayım, 200X büyütmede çekilen fotoğrafın Axiovision programına aktarılmasından sonra sayım modülünden yararlanılarak yapıldı. Sayım yapıldıktan sonra her birey için seminifer tübül başına düşen apoptotik germ hücre sayısı hesaplandı.

Ovaryum dokusunda apoptotik hücre sayımı her balık için bir ovaryum dokusu kesitinde birbirinden bağımsız, rastgele seçilen üç farklı bölgede 400X büyütme kullanılarak iki farklı safhadaki ovaryum foliküllerinde yapıldı. Her bölge için folikül başına düşen apoptotik folikül hücre sayımı, 5 adet perinükleolar ve 5 adet erken vitellogenik (geç kortikal alveolar) folikülde, TUNEL pozitif folikül hücreleri sayılarak yapıldı. Daha sonra folikül başına düşen hücre sayısı hesaplandı. Üç farklı bölgeye ait folikül başına düşen apoptotik folikül hücre sayılarının (teka ve granuloza hücreleri) ortalaması sonucu elde edilen değerler her balık için ayrı ayrı hesaplandı. Her birey için ovaryum dokusunda 30 ovaryum folikülü sayıldı. Çok sayıda (>%50) TUNEL pozitif folikül hücresi içeren ya da zona radiata tabakasında bozulmaya sahip olan foliküller, atretik folikül olarak kabul edildi. Her birey için atretik folikül sayısı üç farklı gözlem alanında sayılıp, ortalama değerleri hesaplanarak belirlendi. Atretik folikül sayısı, kesit içindeki total (sağlıklı ve atretik) folikül sayısının %'si olarak ifade edildi (Savabieasfahani ve ark., 1999).

3.6. CYP1A enziminin immunohistokimyası

CYP1A enziminin karaciğer dokusundaki immunohistokimyasal lokalizasyonunu belirlemek için aşağıda verilen protokol kullanıldı. Her gruba ait altı bireyin, %10'luk nötral tamponlu formalin tespitli ve parafine gömülmüş karaciğer dokularından 4 µm kalınlığındaki kesitler alınıp polilizin kaplı lamlara aktarıldı. Kesitler, deparafinize ve rehidrate edildikten sonra metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilerek endojen peroksidaz aktivitesi inaktif hale getirdi. PBS (pH: 7.4) ile yıkanan kesitler, sitrat tamponu (0.1 M, pH: 6) ile 100 °C'de 15 dk muamele edildi daha sonra PBS ile birkaç kez yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için at serumu ile oda sıcaklığında 20 dk inkübasyona bırakılan kesitler, PBS ile üç kez beşer dk yıkandıktan sonra PBS ile 1:100 oranında sulandırılan primer antikor (Fare anti balık CYP1A peptid monoklonal antikor, C10-7, Biosense Lab., Norveç) ile 4 °C'de nemli ortamda bir gece inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki boyama basamaklarında, biyotinli anti-fare sekonder antikoruna içeren ABC kit (Fare UniTect ABC Kit, Kat. No: XHC01, Calbiochem, Merck, ABD) protokollerine uyuldu. Özetle; kesitler PBS ile yıkandıktan sonra biyotinli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Lamlar PBS ile yıkandıktan sonra avidin-biyotin horseradish peroksidaz kompleks karışımı ile 30 dk inkübe edildi. Daha sonra doku geçirgenliğini artırmak için PBS ile hazırlanan %1'lik Triton X-100 ile 30 s. yıkandı. Kesitler, DAB (3,3'-diaminobenzidin) ile 1-3 dk inkübe edildikten sonra bidistile su ile yıkandı. Zıt boyama Mayer'in Hematoksilen boyası ile yapıldı. Lamlar dereceli etanolden (%95, %100) ve ksilenden geçirilerek entallan ile kapatıldı. Negatif kontrol olarak bir kesitte primer antikor yerine PBS kondu. Preparatlar, Nikon Eclipse E600 marka araştırma mikroskobu ile incelendikten sonra görüntüleri alındı. Kesitlerin değerlendirilmesi ve puanlanması, **1.** Hücrenin sitoplazmik alanında boyanmanın dağılımına göre, (Sitoplazmik alanda boyanma yok ise, (%0, -); sitoplazmik alanda kısmen boyanma varsa (%50, +), sitoplazmik alanda büyük oranda boyanma varsa (%80-90, ++), sitoplazmik alan tamamen boyanmış ise (%100, +++)). **2.** Sitoplazmik alandaki boyanmanın yoğunluğuna göre, (Negatif, (-); hafif şiddetli (+), orta şiddetli (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++)). **3.** 1. ve 2. kriterlere göre incelenen

hücrelerin kesitteki dağılımına göre, (Homojen, (a); heterojen, (b)) olmak üzere üç kritere göre yapıldı.

3.7. Plazma steroid seviyeleri

Plazma 17β -östradiol ve total testosteron (T) konsantrasyonları, solid faz kompetitif kemoluminesent immünassay (Immulite 2000, Siemens, Almanya) yöntemi ile belirlendi. Minimum ve maksimum belirlenme limiti, 17β -östradiol için 20 pg/ml ve 2000 pg/ml, T için 20 ng/dl ve 2000 ng/dl'dir.

3.8. Karaciğer hücre izolasyonu ve kültürü

Karaciğer hücre kültürü için ortalama 9.5 cm çatal boylu ve 8.5 g total vücut ağırlıklı inci kefalı kullanıldı. Kültür öncesi bütün cam malzemeler ve cerrahi aletler kuru hava sterilizatöründe steril edildi (130 °C'de 2 saat). Ayrıca kullanılacak olan solüsyonlar ve medyum 0.22 µm por açıklığına sahip filtreden (MFS Advantec, USA) geçirildi. Karaciğer hücre izolasyonu iki-basamak perfüzyon metoduna göre, Tollefsen ve ark., (2003) ve Mortensen ve ark., (2006)'ndan bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Steril koşullarda balığın abdomen bölgesi açıldıktan sonra karaciğer dokusu çıkartıldı. Çıkartılan karaciğer, kalsiyumsuz 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 (Etilen glikol tetra-asedik asit, Fluka, Kat. No: C3777, 20 mg/l) içeren solüsyon içerisine alınarak dokudan kan uzaklaştırılmaya kadar oda sıcaklığında 10 dk yıkandı (balığa ait karaciğerin küçük olmasından ve portal venin kanüle edilememesinden dolayı in situ perfüzyon yapılamadı). Beyazlaşan karaciğer bu kez EGTA yerine CaCl₂ (0.22 g/l) ve kollajenaz (%15, Sigma-Aldrich, Kat. No: C5138, Type IV) içeren aynı tampona alındıktan sonra ajite edilerek yıkandı. Karaciğer aynı solüsyon içinde yaklaşık 15 dk tritürasyon işlemine tabi tutuldu. Tritürasyon, önce, kesik uçlu mavi pipet ucu ile daha sonra mavi pipet ucu ile yapıldı. Bu işleme daha sonra sarı pipet ucu ve insülin

enjektörüyle devam edilerek dokuya ait hücrelerin iyice ayrışması sağlandı. İşlem tamamlandıktan sonra, süspansiyon 100 g'de 3dk santrifüj edildi ve süpernatant içindeki kaba doku partikülleri pipetlendi. Pellet üzerine antibiyotik-antimikotik (%1), NaHCO₃ (0.38 g/l) ve glutamin içeren serumsuz L15 (Leibovitz 15, Sigma Kat. No: L1518) medyumunu eklendi. Hücreler tekrar süspansiyon edildikten sonra 60 g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak üzerine medyum eklendi ve santrifüj işlemi enzimin uzaklaşması için en az üç defa tekrarlandı. Tekrar süspansiyon edilen hücreler bu defa 30 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı (bu devirde çok az da olsa önceden var olan eritrositlerin uzaklaştığı gözlemlendi) ve izole edilen hücreler 1 ml medyum ile tekrar süspansiyon edildi. Hücre canlılığı, tripan mavisi eksklüzyon metodu kullanılarak yapıldı ve solüsyon içindeki hücre canlılığının % 95'ten fazla olduğu belirlendi. Hücre süspansiyonunda ml'deki hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler 48 kuyulu mikropolanın (Greiner Bio-one, Cellstar, Kat. No: 677180) her kuyusunda 1x10⁶/ml hücre olacak şekilde L15 medyumda ekildi. Kültüre alınan hücreler daha sonra invert mikroskop (Leica DMI 6100) ile incelenerek görüntüleri alındı. Hücreler kimyasal uygulamasından önce O₂/CO₂'siz steril inkübatörde 20±1 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.9. Hücre kültürü kimyasal uygulama

Test kimyasalları olan 17 α -Ethinilestradiol (EE, saflık: \geq %98, Sigma) ve 4-*n*-Nonilfenol (NP, saflık: %99, Riedel de Hæn), DMSO (Dimetil sülfoksit, Merck) içinde çözüldükten sonra 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde kültür vasatına eklendi. Vasat içindeki DMSO konsantrasyonu, %0.1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı. Kuyulara ekilen hücrelerin üzerindeki vasat alınarak EE ve NP'nin 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarını içeren vasat ile değiştirildi. Kontrol grubuna ait kuyudan alınan medyum ise sadece L15 ile değiştirildi. Her grup için iki tekrar yapıldı. Hücreler, O₂/CO₂'siz steril inkübatörde 20±1 °C'de 24 saat kimyasallara maruz bırakıldı.

3.10. Hücre süspansiyonunda TUNEL ve PI çift boyama

Kimyasal uygulaması tamamlandıktan sonra, hücreler pipetlenerek kaldırıldı ve buldukları medyum içinde bir ependorf tüpe alınarak süspanse edildi. Hücre süspansiyonunda apoptotik DNA fragmentli hücre çekidekleri TUNEL yöntemi ile işaretlendi. TUNEL boyama ticari kit (Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Kat. No: QIA39, Calbiochem, Merck, ABD) kullanarak ve kit prokollerine uyularak yapıldı. Süspanse edilen hücreler, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra medyum pipetlendi. Hücreler PBS ile hazırlanan %4'lük formalin ile 10 dk tespit edildikten sonra 1000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edildi. Fiksatif pipetlenerek alındı ve hücreler %80'lik etanol ile tekrar süspanse edildi. Santrifüj edilen süspansiyon pipetlendikten sonra TBS (20 mM Tris pH: 7.6, 140 mM NaCl) ile süspanse edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. Hücreler, santrifüleme basamağından sonra proteinaz K (10mM Tris'de, pH:8, 2 mg/ml) ile oda sıcaklığında 5 dk muamele edildi. Süspansiyon santrifüjlenip proteinaz K uzaklaştırıldıktan sonra TdT tamponu (1 M Sodyum kakodilat, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA, 3.75 mM CoCl₂, pH: 6.6) ile tekrar süspanse edilen hücreler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra süspansiyon santrifüj edilerek TdT tamponu uzaklaştırıldı ve hücreler floresan (FITC) işaretli deoksiniükleotidler ve TdT enzimini (3 µl enzim, 57 µl TdT işaretleme karımı) içeren karışım ile 37 °C'de karanlık ortamda 60 dk inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra süspansiyon santrifüj edilerek işaretleme karışımı uzaklaştırıldı. Hücreler, TBS ile muamele edildikten sonra santrifüj edildi ve TBS ile iki defa daha yıkandı. Son olarak hücreler 0.5 ml TBS'de tekrar süspanse edildi. Son süspansiyona propidyum iyodür (PI, 2 µg/ml) eklenerek zıt boyama yapıldı. Pozitif kontroller, proteinaz K uygulamasından sonra, süspansiyon DNaz I (TBS ile hazırlanan 1mM MgSO₄'de 1µg/µl, Kat. No: A3778, AppliChem) enzimi ile oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonu ile yapıldı. Negatif kontroller de ise işaretleme karışımına, TdT enziminin yerine bidistile su katıldı. Diğer basamaklar her iki kontrolde de yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Boyanan hücreler floresan mikroskopta (Leica DMI 6100) incelendi.

3.11. Flow (akım) sitometride apoptotik hücre sayımı

EE ve NP'ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefalı karaciğer hücrelerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantifikasyonu TUNEL metodu ile işaretlenen hücrelerin flow (akım) sitometride (Coulter Epics XL) ölçümü ile yapıldı. Hücreler TUNEL-PI boyamasından sonra yeşil floresan (FITC, apoptotik DNA fragmentasyonunu belirtmektedir) ve kırmızı (PI, total DNA miktarını belirtmektedir) floresanda analiz edildi. Hücre sayımında ortak pozitif (FITC⁺/PI⁺) hücreler, apoptotik olarak tanımlandı. Apoptotik hücre sayısı, total hücre popülasyonunun (FITC⁺/PI⁺ ve FITC⁻/PI⁺; apoptotik ve apoptotik olmayan hücrelerin toplamı) yüzdesi olarak hesaplandı. FITC⁻/PI⁻ gibi boyanmayan yapılar hücre kalıntısı olarak, FITC⁺/PI⁻ gibi boyanan yapılar ise artefekt olarak kabul edilip sayıma dahil edilmedi. Her örnek için en az 2000 hücre sayıldı.

3.10. İstatistiksel analizler

Bütün istatistiksel analizler “SPSS 11.5 for Windows” programı kullanılarak yapıldı.

Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde, grup sayısı ikiden fazla olduğu için, Kruskal Wallis varyans analizi testi kullanıldı. Uygulama ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların tanımlanmasında Post hoc Mann-Whitney U testi kullanıldı.

Plazma 17 β estradiol seviyesi ölçümü sonucunda elde edilen veriler ANOVA'ya tabi tutulduktan sonra Scheffe testi ile değerlendirildi.

Bazı gruplarda total T ölçümü yapılan örnek sayısının az olması ya da hiç olmaması, ANOVA gibi gruplar arası kıyaslama yapmaya olanak veren istatistiksel analiz yöntemlerinin kullanımına izin vermediğinden gruplar arası kıyaslama, bireylerin plazmasında testosteronun belirlenip belirlenmeme durumuna göre Ki kare testi ile gerçekleştirildi.

Flow sitometrik analizler sonucu elde edilen veriler ise ANOVA'ya tabi tutulduktan sonra Dunnet's testi ile değerlendirildi.

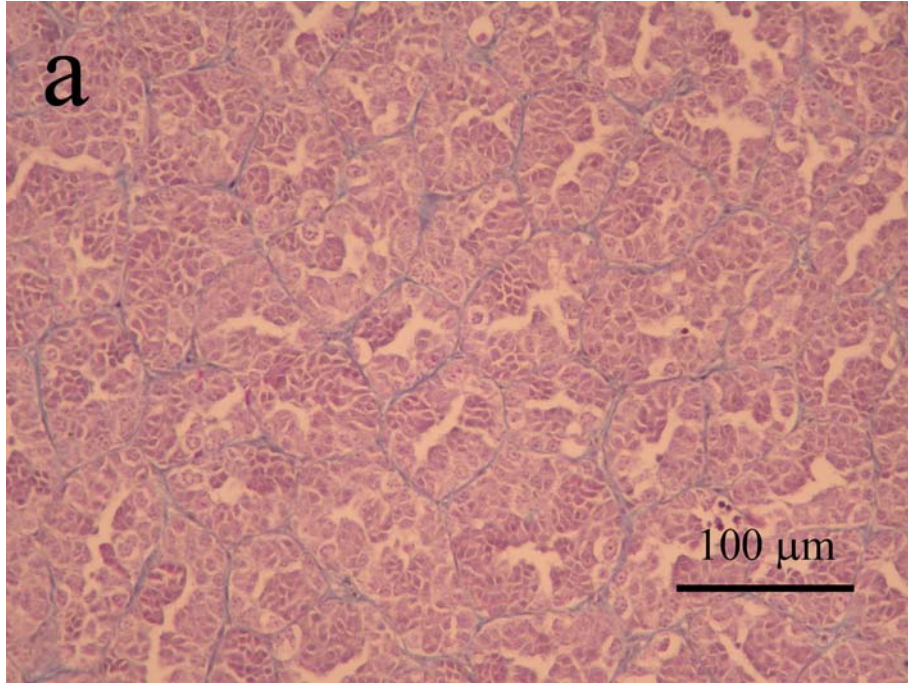
Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Ortalama±Standart Hata ve medyan olarak, diğer analizler sonucunda elde edilen veriler ise Ortalama±Standart Hata olarak ifade edildi. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

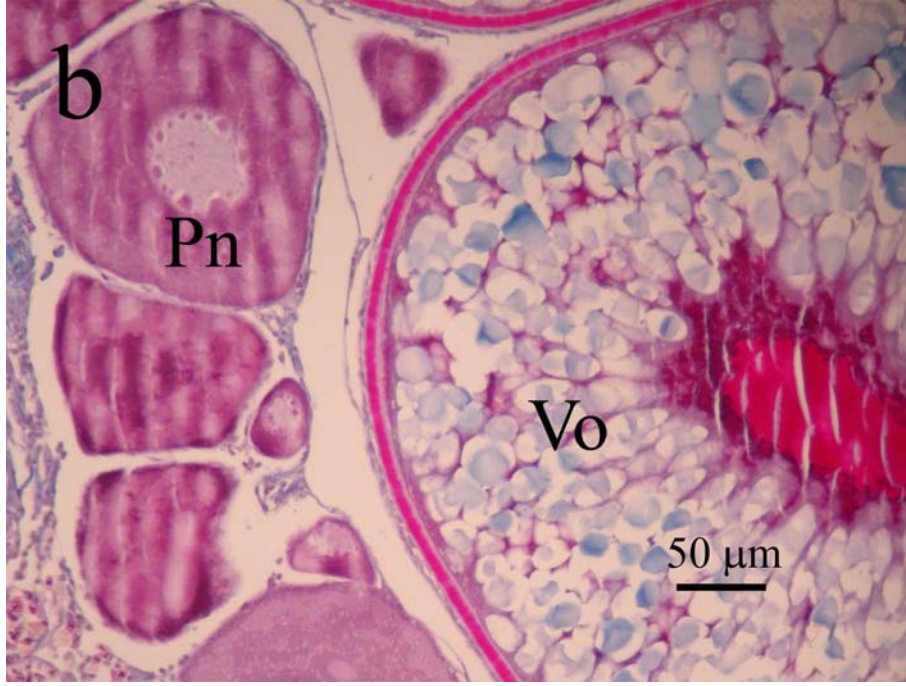
4.1. Gonad histolojisi ve yaş tayini

Testisten alınan histolojik kesitlerde testis gelişiminin prespermatogenik evrede olduğu ve seminifer tübüllerde sadece spermatogonyumların bulunduğu gözlemlendi (Şekil 1a). Ovaryum dokusundan alınan histolojik kesitlerde, ovaryum gelişim aşamasının erken vitellogenik (geç kortikal alveolar) evrede olduğu, ovaryumların erken vitellogenik oositlerin (geç kortikal alveolar) yanı sıra perinükleer oositleri de içerdiği belirlendi (Şekil 4.1b).

Operkular yaş tayini sonucunda, çalışmada kullanılan dişi ve erkek balıkların 3+ yaşlı bireyler olduğu saptandı.



Şekil 4.1a. Kontrol grubuna ait erkek inci kefalinde prespermatogenik safhadaki testis, (Mallory trikrom).



Şekil 4.1b. Kontrol grubuna ait dişi inci kefalinde erken vitellogenik safhadaki oositleri içeren ovaryum, (Pn: perinükleer oosit; Vo: vitellogenik oosit; Mallory trikrom).

4.2. Apoptoz ve gonad histopatolojisi

EE ve NP'ye maruz bırakılan balıkların karaciğer ve gonadlarından alınan kesitler TUNEL metodu ile boyandı. Buna göre apoptotik hücreler nukleuslarının kahverengi boyanması, apoptotik olmayan hücreler ise nukleuslarının yeşil boyanması ile ayırt edildi.

Gonadlardan alınan kesitlerde fibrotik alanların belirlenmesi ise Mallory trikrom boyası ile mavi boyanan bağ dokusu dikkate alınarak yapıldı.

EE ve NP'ye maruz bırakılan dişi balıkların karaciğer ve ovaryum dokularında belirlenen apoptotik hücre sayımları Çizelge 4.1'de gösterildi. Buna göre her iki kimyasala maruz kalan dişi balıkların karaciğerlerindeki apoptotik hepatosit sayısının bu kimyasalların konsantrasyonlarına bağlı olarak arttığı gözlemlendi. Bu artışın NP'nin en yüksek konsantrasyonu olan 200 µg/l ve EE'nin en yüksek konsantrasyonu olan 100 ng/l'de, kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.001$). Dişi bireylerde kontrol ve uygulama gruplarından alınan karaciğer dokusu kesitlerinde

yapılan TUNEL boyamalara ait temsili resimler Şekil 4.2a,b, Şekil 4.3a,b,c, Şekil 4.4a,b,c'de gösterilmiştir.

Ovaryum dokusundaki apoptotik hücre sayısı, folikül başına düşen apoptotik somatik hücre sayısına göre belirlendi. Buna göre, NP'ye maruz bırakılan balıklarda ovaryum folikül başına düşen apoptotik somatik hücre sayısının doza bağımlı olarak arttığı ancak bu artışın sadece 200 µg/l konsantrasyonunda anlamlı olduğu bulundu ($P < 0.05$) (Çizelge 4.1). EE'ye maruz bırakılan gruplarda folikül başına düşen apoptotik somatik hücre sayısında konsantrasyon artışı ile birlikte bir artışın olduğu belirlendi. Bu artışın, EE'nin en yüksek konsantrasyonu olan 100 ng/l'ye maruz bırakılan balıklarda istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($P \leq 0.01$). Dişi bireylerde kontrol ve uygulama gruplarından alınan ovaryum dokusu kesitlerinde yapılan TUNEL boyamalara ait resimler Şekil 4.5a,b, Şekil 4.6a,b,c, Şekil 4.7a,b,c'de gösterilmiştir.

EE ve NP'ye maruz bırakılan dişi balıkların ovaryum dokusundaki, % atretik oosit sayısında konsantrasyon artışı ile birlikte bir artışın olduğu, bu artışın NP uygulanan gruplarda anlamsız olduğu belirlendi (Şekil 4.8a,b, Şekil 4.9a,b,c). Bununla birlikte, EE'nin 10 ng/l konsantrasyonunda % atretik folikül sayısında artış eğilimi olduğu ($P = 0.08$) ve bu artışın EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$) (Çizelge 4.1).

EE ve NP'ye maruz bırakılan gruplardaki bazı balıklarda oositler arasındaki stromal dokuda kalınlaşma (fibrozis) olduğu (Çizelge 4.1, Şekil 4.9a,b,c), bu bölgelerde çok sayıda apoptotik hücre ölümünün varlığı gözlemlendi (Şekil 4.6b,c, Şekil 4.10a,b). Bununla birlikte kontrol gruplarına ait birer bireyde de bilinmeyen bir nedenden dolayı stromal dokuda kalınlaşmanın olduğu belirlendi (Çizelge 4.1).

EE ve NP'ye maruz bırakılan erkek balıkların karaciğer ve testis dokularında yapılan apoptotik hücre sayımları Çizelge 4.2'de gösterildi. EE'ye maruz bırakılan erkek bireylerin karaciğer dokusunda hücre ölümünün konsantrasyon artışına paralel olarak artış gösterdiği ve bu artışın kontrol grubuna kıyasla en yüksek dozda (100 ng/l) istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi ($P < 0.01$). NP'ye maruz kalan erkek bireylerde de karaciğerde hücre ölümünün doza bağımlı olarak arttığı ve bu artışın NP'nin en yüksek konsantrasyonunda (200 µg/l) istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$). Erkek bireylerde kontrol ve uygulama gruplarından alınan

karaciğer dokusu kesitlerinde yapılan TUNEL boyamalara ait resimler, Şekil 4.11a,b, Şekil 4.12a,b,c, Şekil 4.13a,b,c'de gösterilmiştir.

EE ve NP'ye maruz bırakılan erkek ve dişi bireylerde cinsiyete bağlı bir hassasiyetin olup olmadığının belirlenmesi için aynı konsantrasyona maruz bırakılan dişi ve erkek bireylerin karaciğer dokusunda, apoptotik hücre sayımı sonucu elde edilen veriler Kruskall Wallis Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı bulundu.

EE ve NP'ye maruz bırakılan hem erkek hem de dişi bireylerde karaciğerde hücre ölümünün merkezi ven ve büyük damarlar etrafında daha yoğun meydana geldiği gözlemlendi (Şekil 4.3b,c, Şekil 4.4b,c, Şekil 4.12b,c, Şekil 4.13b,c).

EE ve NP'ye maruz bırakılan grupların testis dokusundan alınan kesitlerde apoptozun seminifer tübüllerdeki spermatogoniumlarda meydana geldiği görüldü. EE ve NP'ye maruz bırakılan gruplarda seminifer tübül başına düşen apoptotik germ hücresi sayısının EE ve NP'nin en yüksek konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($P < 0.05$) (Çizelge 4.2). Erkek bireylerde kontrol ve uygulama gruplarından alınan testis dokusu kesitlerinde yapılan TUNEL boyamalara ait temsili resimler Şekil 4.14a,b, Şekil 4.15a,b,c, Şekil 4.16a,b,c'de gösterilmiştir.

Histopatolojik incelemelere göre EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta bir bireyde ovotestis tespit edildi (Şekil 4.17a). Bu gruba ait üç bireyde de seminifer tübül etrafındaki intersititiyal bağ dokuda kalınlaşmanın (fibrozis) meydana geldiği görüldü (Şekil 4.18a). NP'ye maruz bırakılan gruplardan 60 µg/l'lik dozda bir bireyde ovotestis (Şekil 4.17b) gözlenirken 60 ve 200 µg/l'lik NP konsantrasyonlarında birer bireyde testiste intersititiyal bağ dokuda kalınlaşmanın (fibrozis) (Şekil 4.18b,c) meydana geldiği belirlendi. EE ve NP'ye maruz bırakılan erkek bireylerde testiste intersititiyel bağ dokusu kalınlaşmasına (fibrozis) ve ovotestis şekillenmesine sahip birey sayıları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. 17α -Etinilestradiol (EE) ve Nonilfenole (NP) maruz bırakılan dişi inci kefalinde karaciğer ve ovaryum dokularında meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantitatif analiz sonuçları, ovaryum % atretik oosit sayısı ve ovaryumunda stromal bağ dokuda kalınlaşmaya sahip birey sayıları. Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Ort. \pm S.H. ve medyan (*m*) olarak ifade edildi

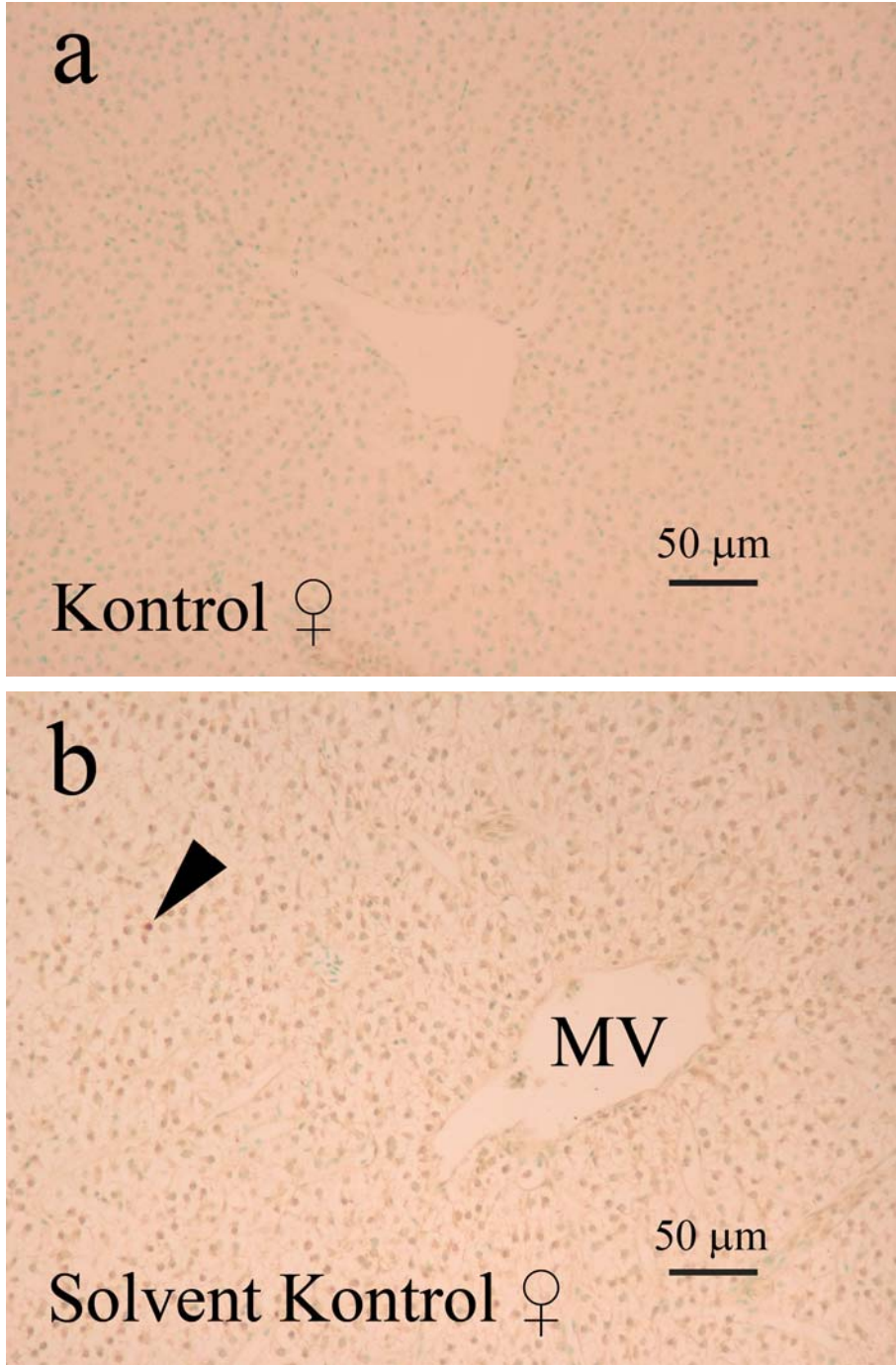
Uygulama Grubu	Karaciğer Dokusu			Ovaryum Dokusu				n ₂
	n ₁	Apoptozu		a		b		
		Ort. \pm S.H.	<i>m</i>	Ort. \pm S.H.	<i>m</i>	Ort. \pm S.H.	<i>m</i>	
Kontrol	10	7.78 \pm 2.05	5.30	0.76 \pm 0.23	0.50	6.47 \pm 2.03	5.93	1
Solvent Kon.	7	8.14 \pm 3.07	5.30	1.35 \pm 0.85	0.33	5.27 \pm 2.61	3.03	1
NP 10 μ g/l	11	8.04 \pm 1.77	7.75	1.38 \pm 0.27	1.10	2.86 \pm 1.56	0.00	2
NP 60 μ g/l	11	11.71 \pm 2.35	10.60	2.21 \pm 0.57	1.90	4.86 \pm 1.96	3.03	3
NP 200 μ g/l	11	29.86 \pm 6.33 ^{***}	23.50 ^{***}	2.83 \pm 1.16 [*]	1.22 [*]	14.5 \pm 8.98	3.03	3
EE 1 ng/l	12	6.90 \pm 1.88	3.30	1.03 \pm 0.27	0.64	3.16 \pm 1.43	1.52	1
EE 10 ng/l	8	10.75 \pm 2.76	9.75	1.60 \pm 0.47	1.25	17.40 \pm 5.12	15.87	1
EE 100 ng/l	12	25.49 \pm 2.22 ^{***}	28.30 ^{***}	2.33 \pm 0.50 ^{**}	1.72 ^{**}	19.34 \pm 5.10 [*]	16.08 [*]	5

n₁: Toplam birey sayısı; a: Ovaryum folikülü başına düşen apoptotik somatik hücre sayısı; b: % atretik oosit (TUNEL ve Morfoloji); n₂: Ovaryumda stromal doku kalınlaşması (fibrozis) gözlenen sahip birey sayısı; *: $P < 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P < 0.001$.

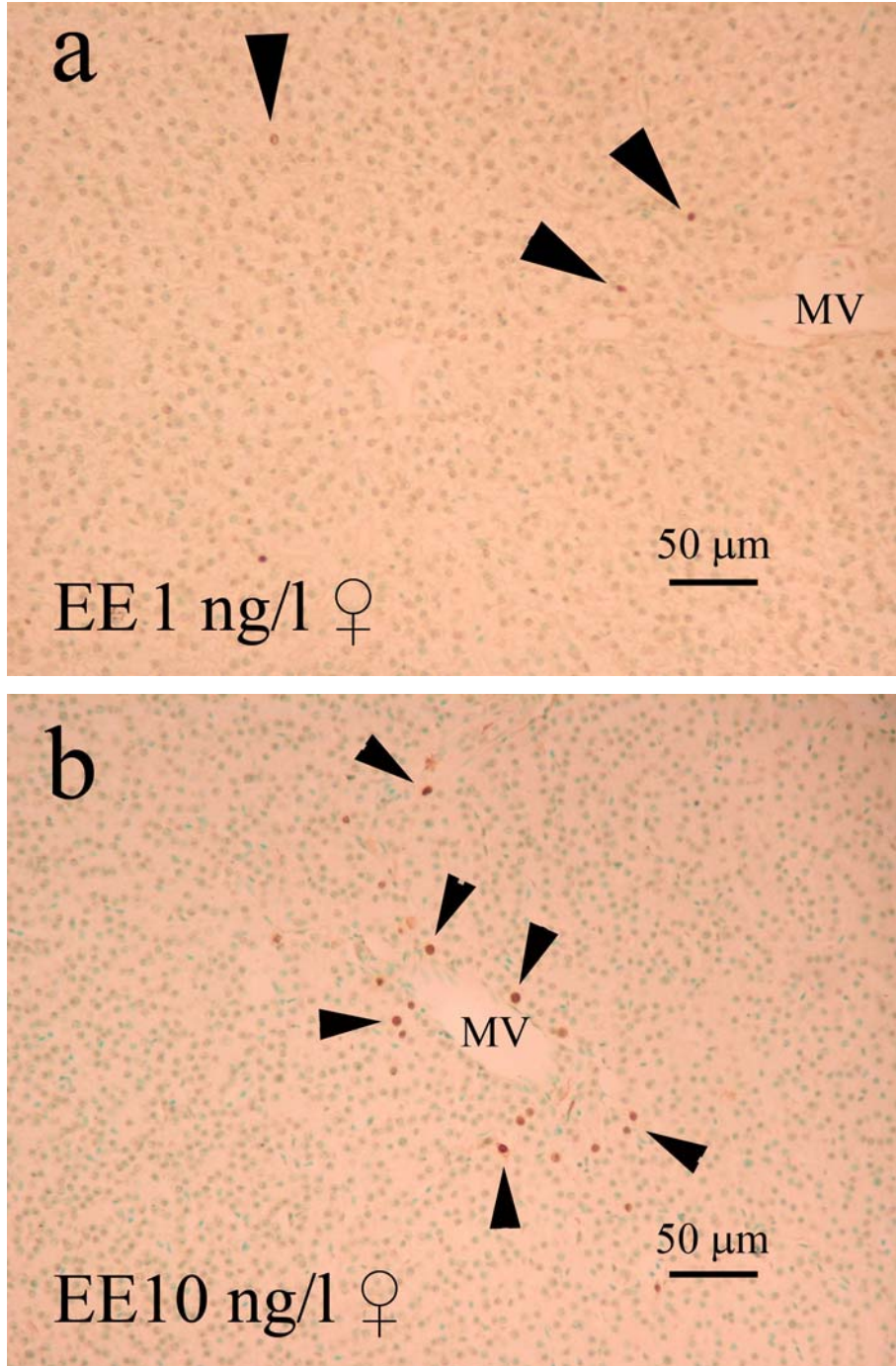
Çizelge 4.2. 17α -Etinilestradiol (EE) ve Nonilfenole (NP) maruz bırakılan erkek inci kefalinde karaciğer ve testis dokularında meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantitatif analiz sonuçları, testiste intersititiyel bağ dokusu kalınlaşmasına (fibrozis) ve ovotestis şekillenmesine sahip birey sayıları. Apoptotik hücre sayımı sonucunda elde edilen veriler Ort. \pm S.H. ve medyan (*m*) olarak ifade edildi

Uygulama Grubu	n	Karaciğer Dokusu Apoptozu		Testis Dokusu			
		Ort. \pm S.H.	<i>m</i>	a		b	c
				Ort. \pm S.H.	<i>m</i>		
Kontrol	6	4.28 \pm 1.42	3.25	0.76 \pm 0.24	0.56	-	-
S. Kontrol	6	3.92 \pm 1.07	3.00	1.21 \pm 0.39	0.92	-	-
NP 10 μ g/l	6	5.23 \pm 1.27	4.55	1.14 \pm 0.43	0.69	-	-
NP 60 μ g/l	6	10.74 \pm 2.13	10.68	2.23 \pm 0.70	1.70	1	1
NP 200 μ g/l	5	13.87 \pm 4.34*	9.75*	2.48 \pm 0.85*	1.85*	1	-
EE 1 ng/l	5	6.15 \pm 1.54	6.60	0.74 \pm 0.24	0.51	-	-
EE 10 ng/l	5	10.29 \pm 3.12	9.75	2.29 \pm 1.19	0.91	-	-
EE 100 ng/l	5	27.87 \pm 4.85**	24.00**	2.08 \pm 0.44*	2.63*	3	1

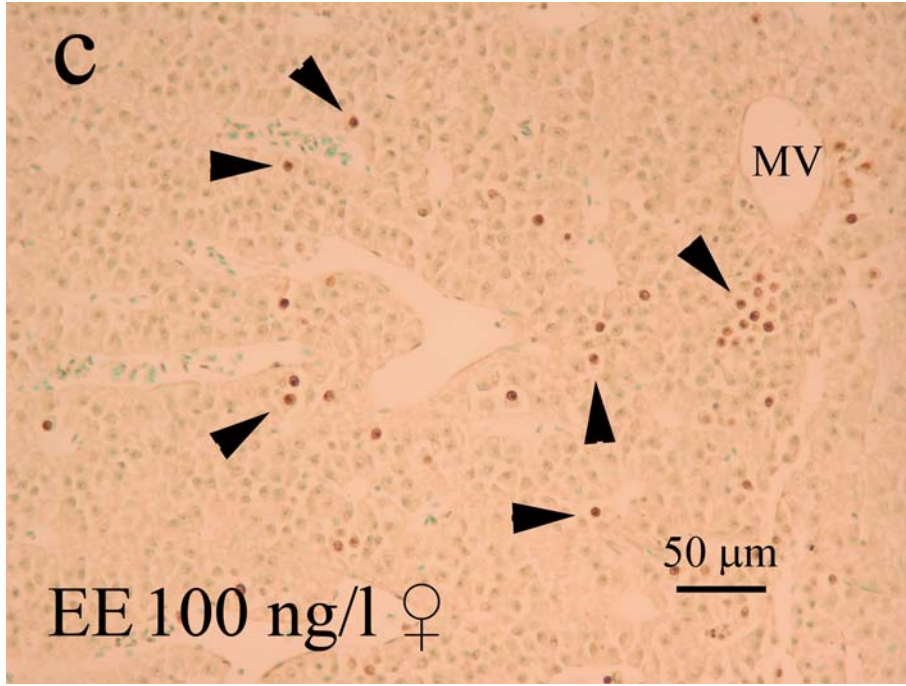
n: Birey sayısı; a: Seminifer tübül başına düşen germ hücre apoptozu; b: Testiste intersititiyel bağ dokusunda kalınlaşmaya sahip birey sayısı; c: Ovotestise sahip birey sayısı; *: $P < 0.05$; **: $P \leq 0.01$.



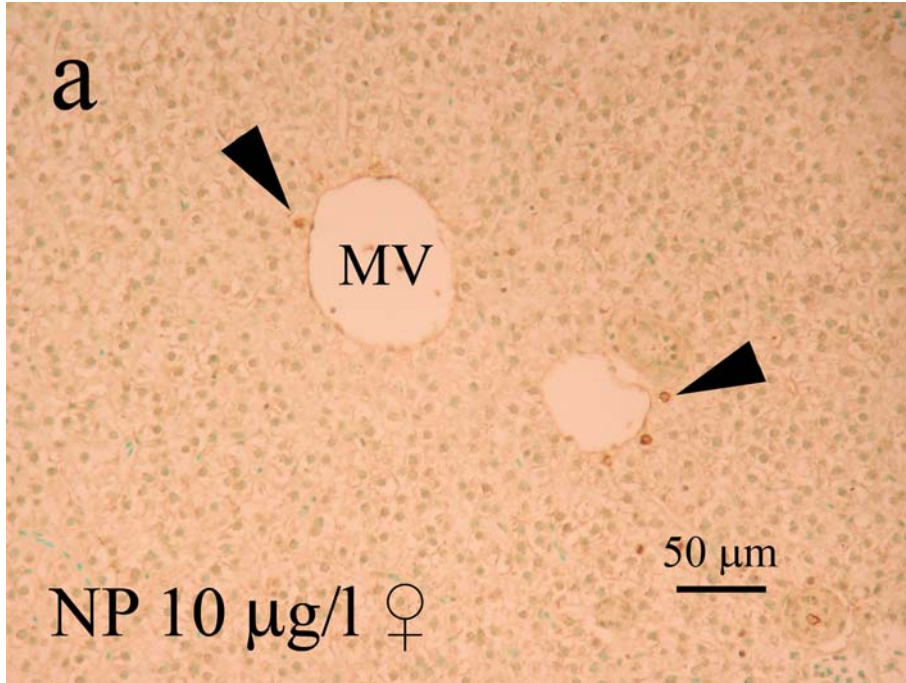
Şekil 4.2a,b. Dişi inci kefalinde, kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başı: apoptotik hepatosit; MV: merkezi ven).



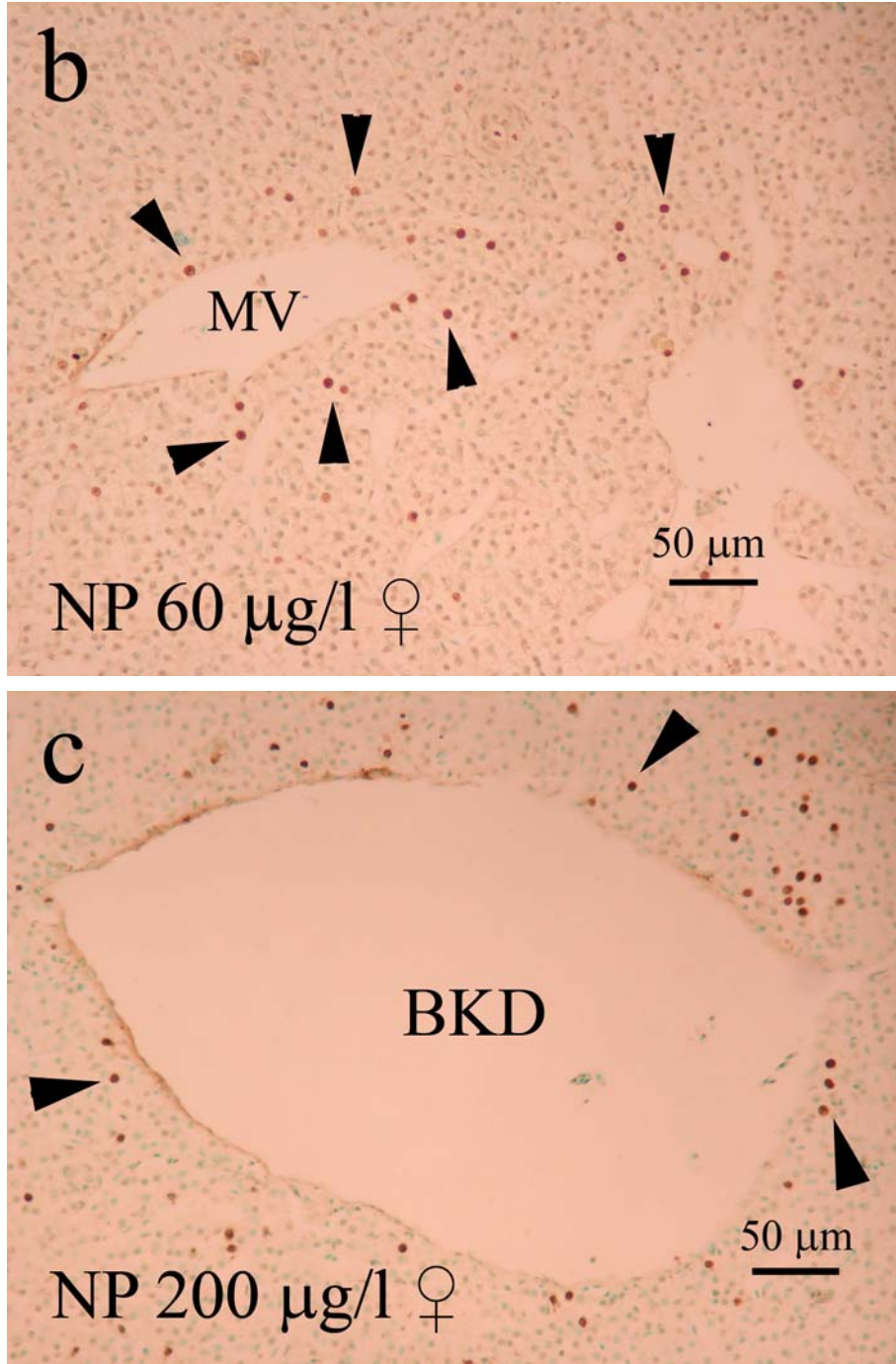
Şekil 4.3a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişinci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).



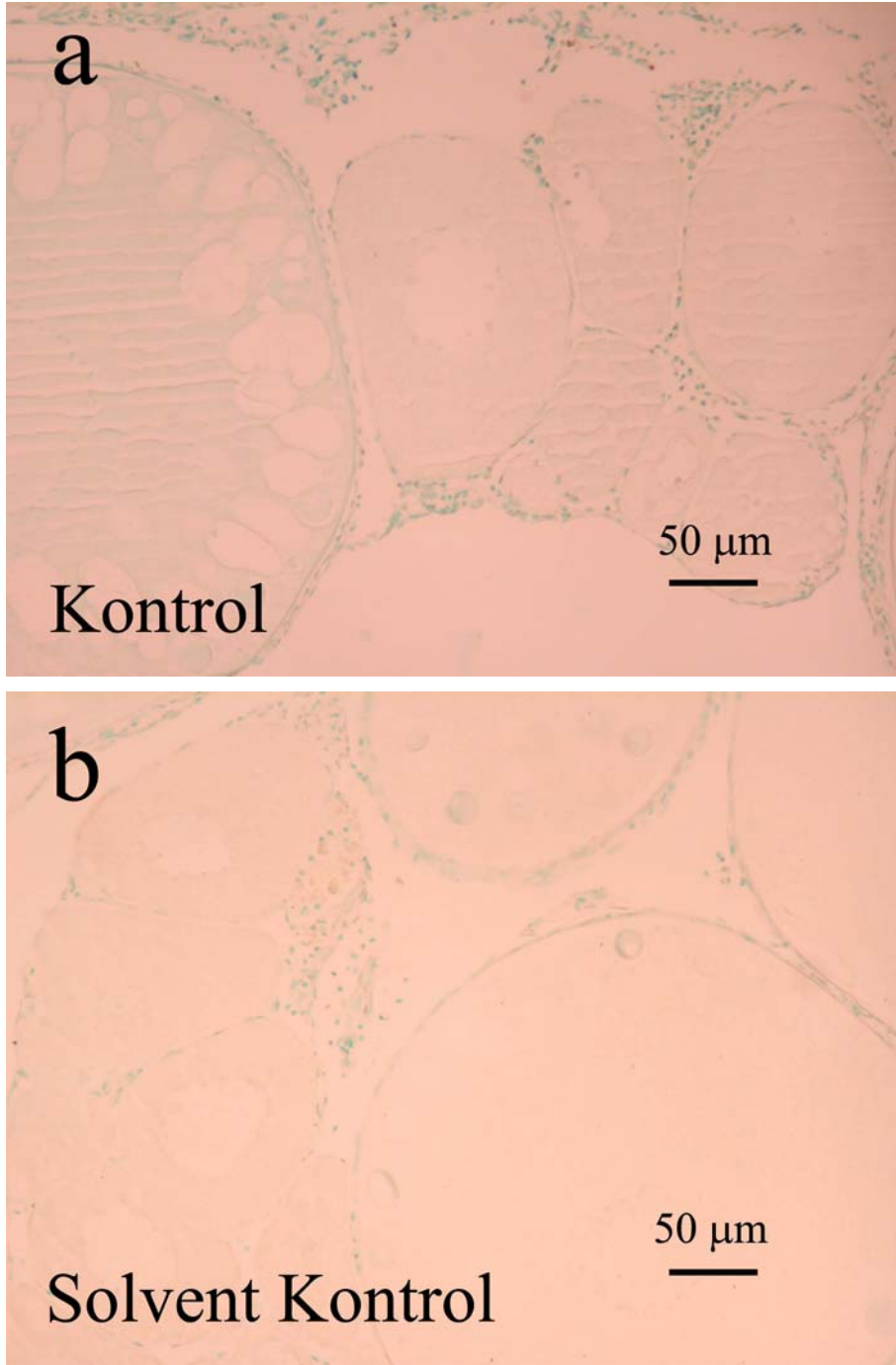
Şekil 4.3c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hücreler; MV: merkezi ven).



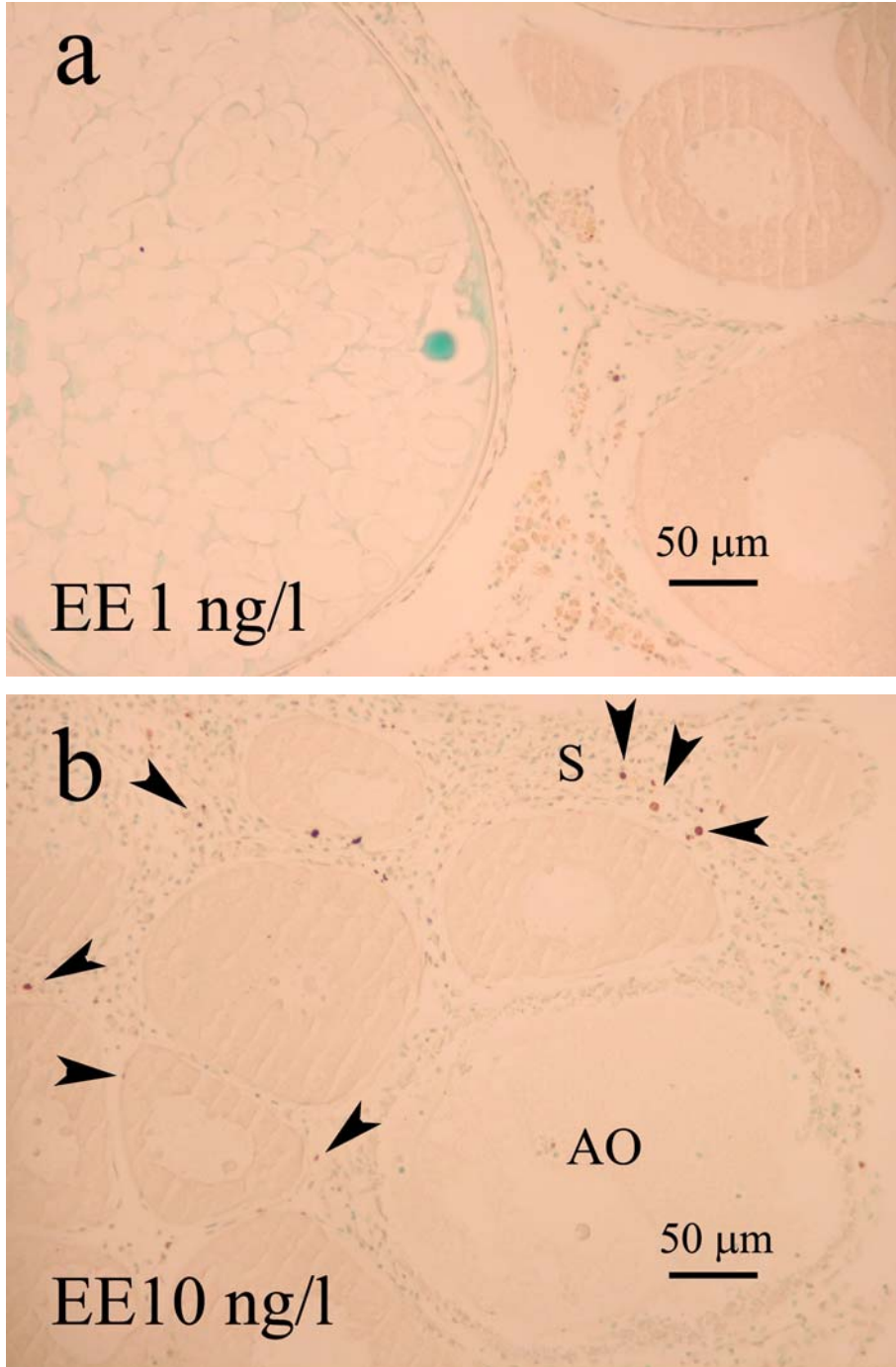
Şekil 4.4a. NP'nin 10 μg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).



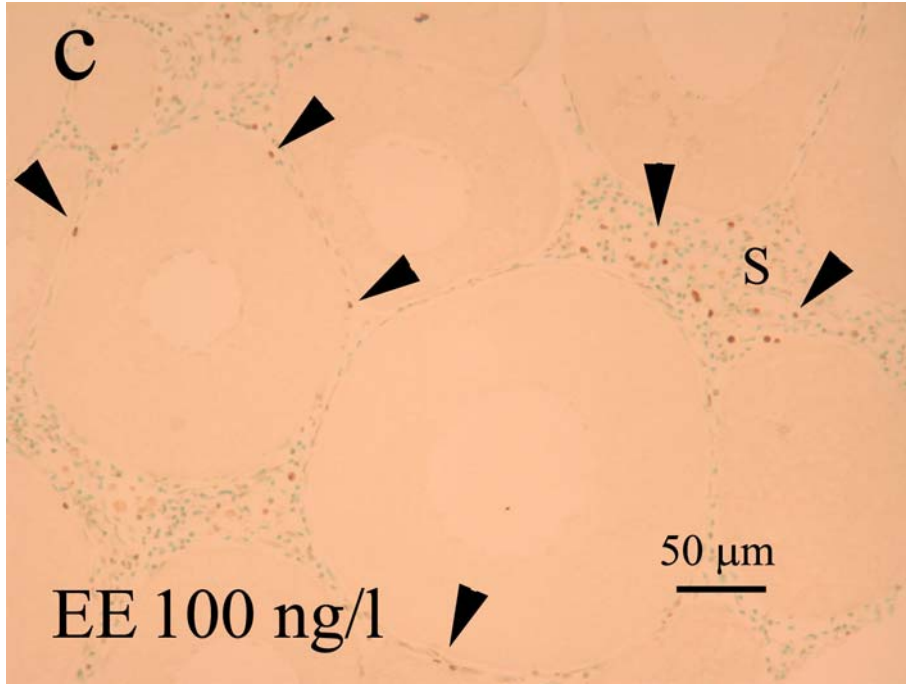
Şekil 4.4b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; BKD: büyük kan damarı).



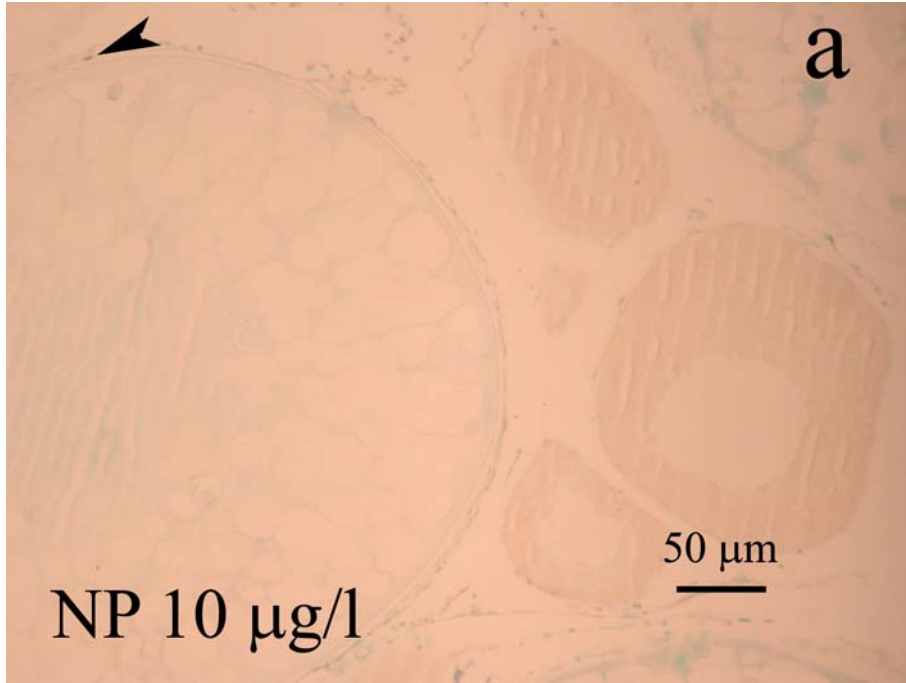
Şekil 4.5a,b. Dişi inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri.



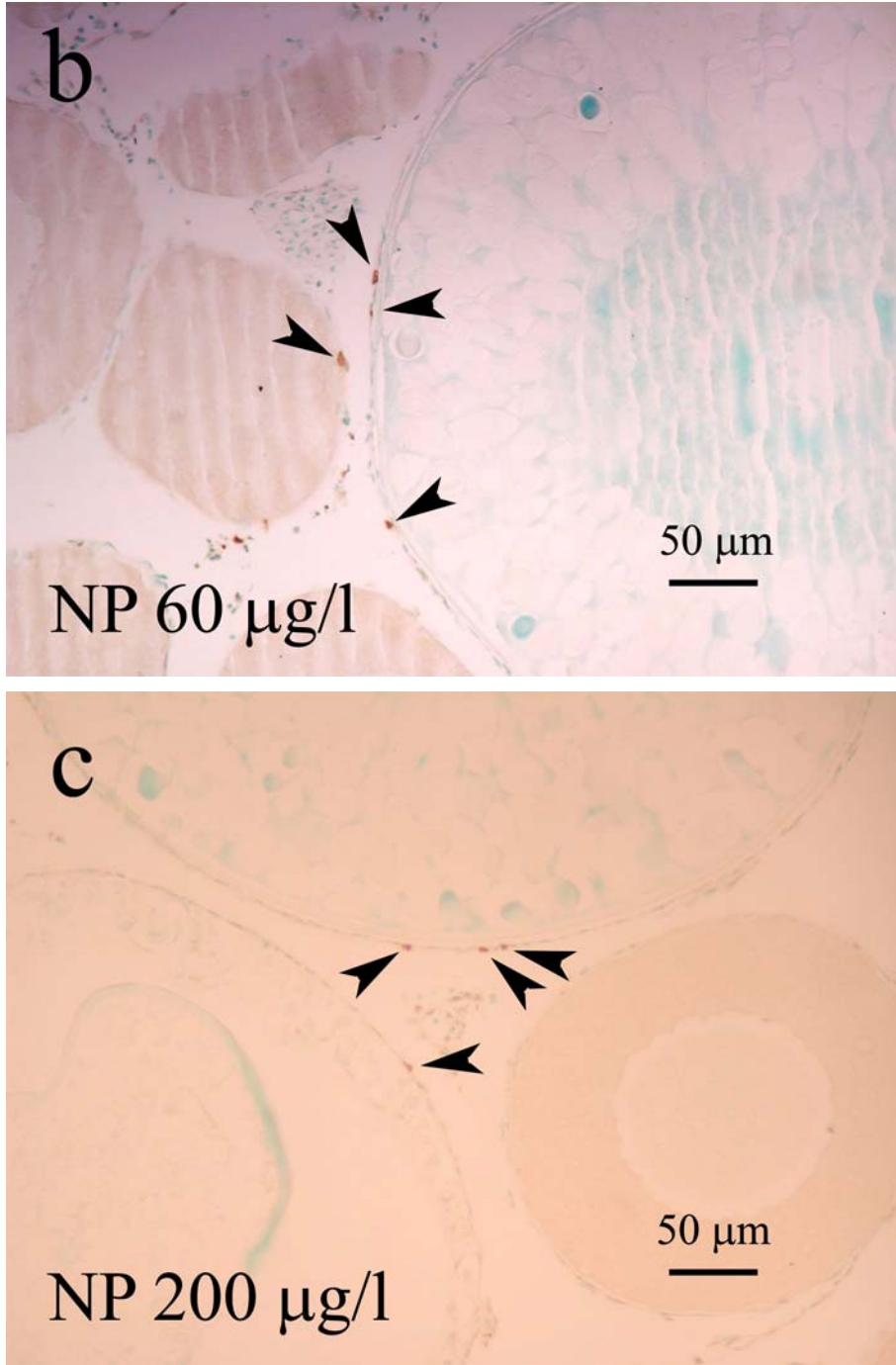
Şekil 4.6a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hücreler; S: stromal doku; AO: atretik oosit).



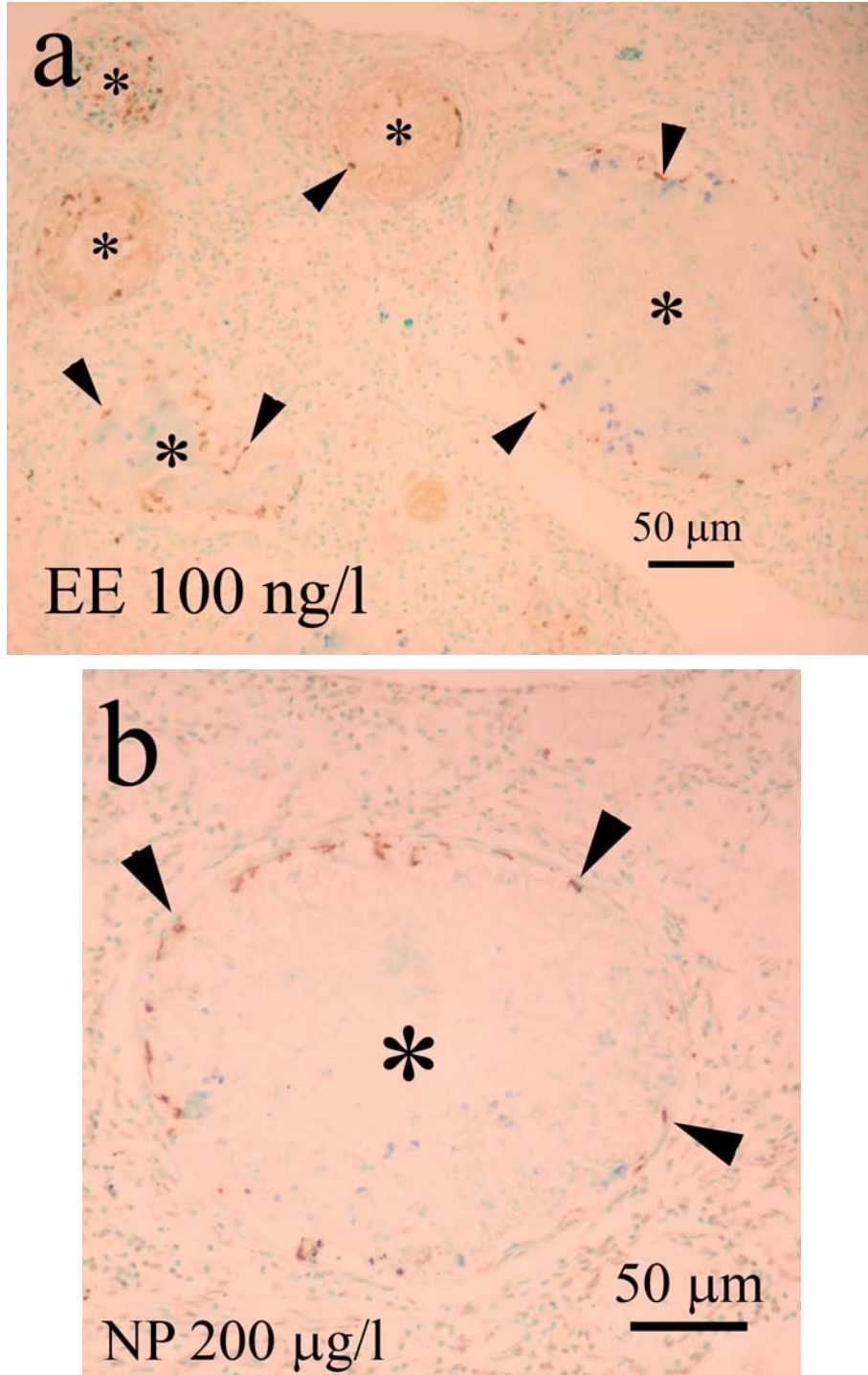
Şekil 4.6c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hücreler; S: stromal doku).



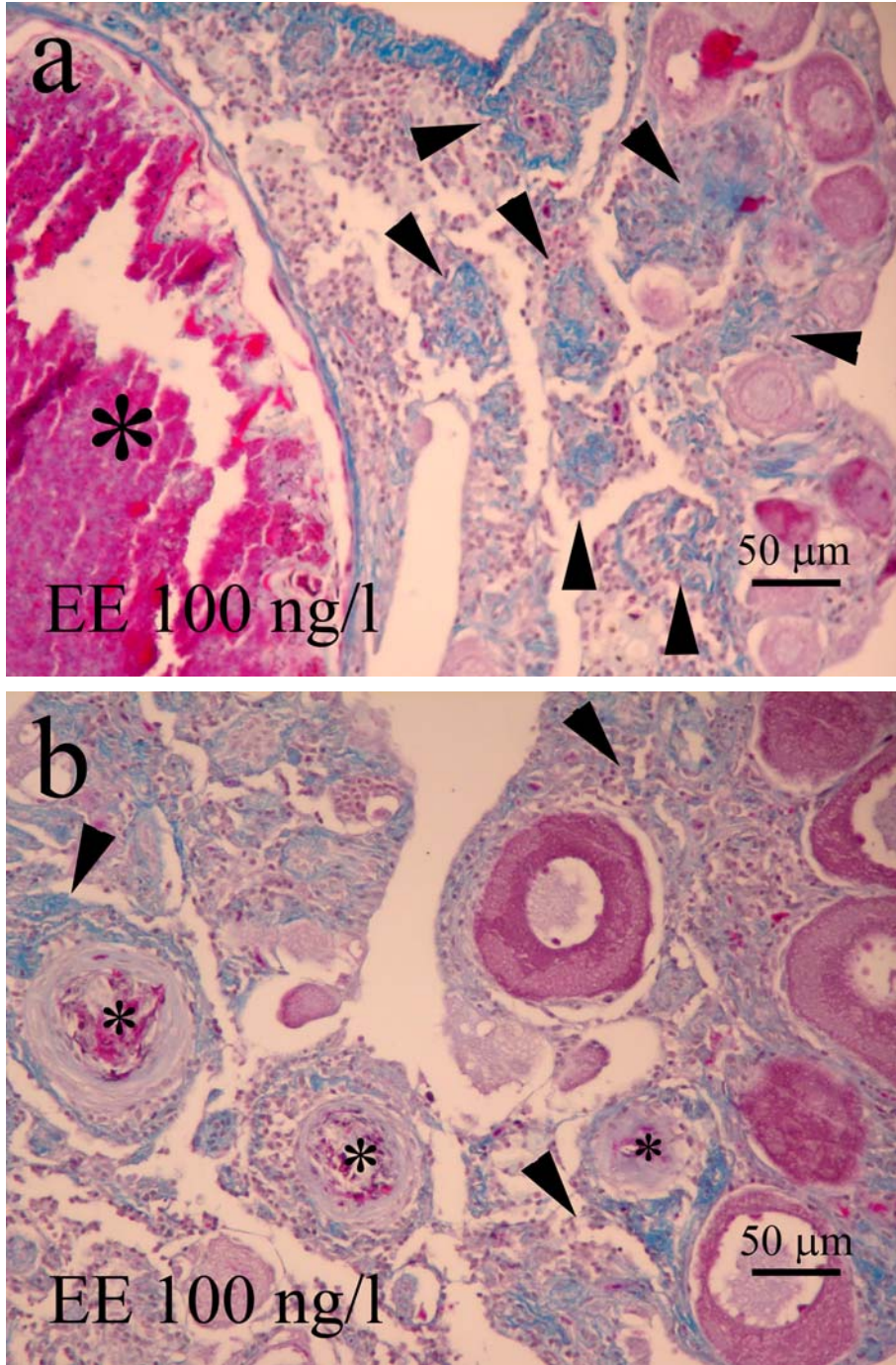
Şekil 4.7a. NP'nin 10 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başı: apoptotik folikül hücresi).



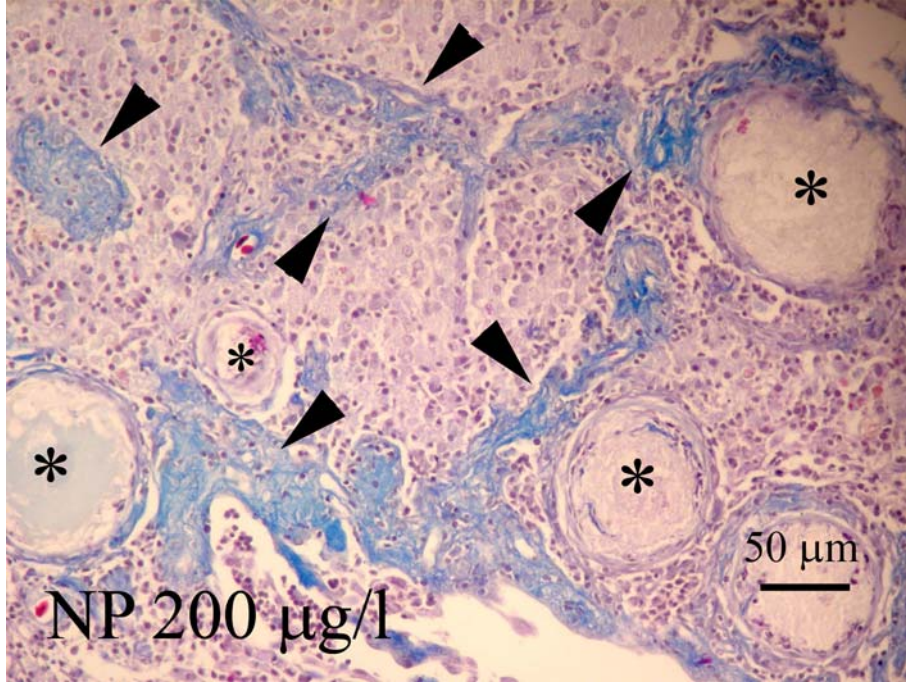
Şekil 4.7b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik folikül hücreleri).



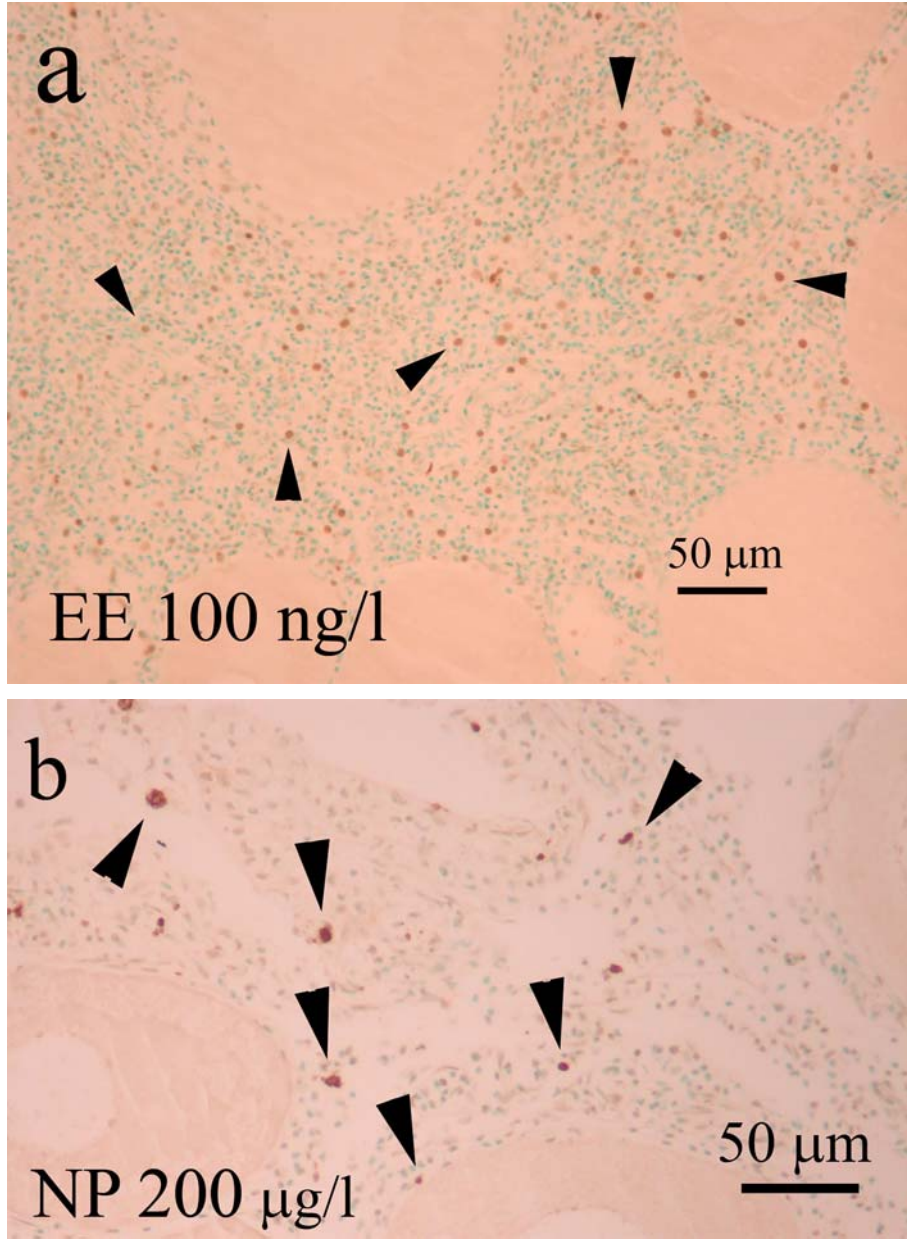
Şekil 4. 8a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 200 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitlerinde atretik oositler (*) ve atretik oositte apoptotik folikül hücreler (ok başları).



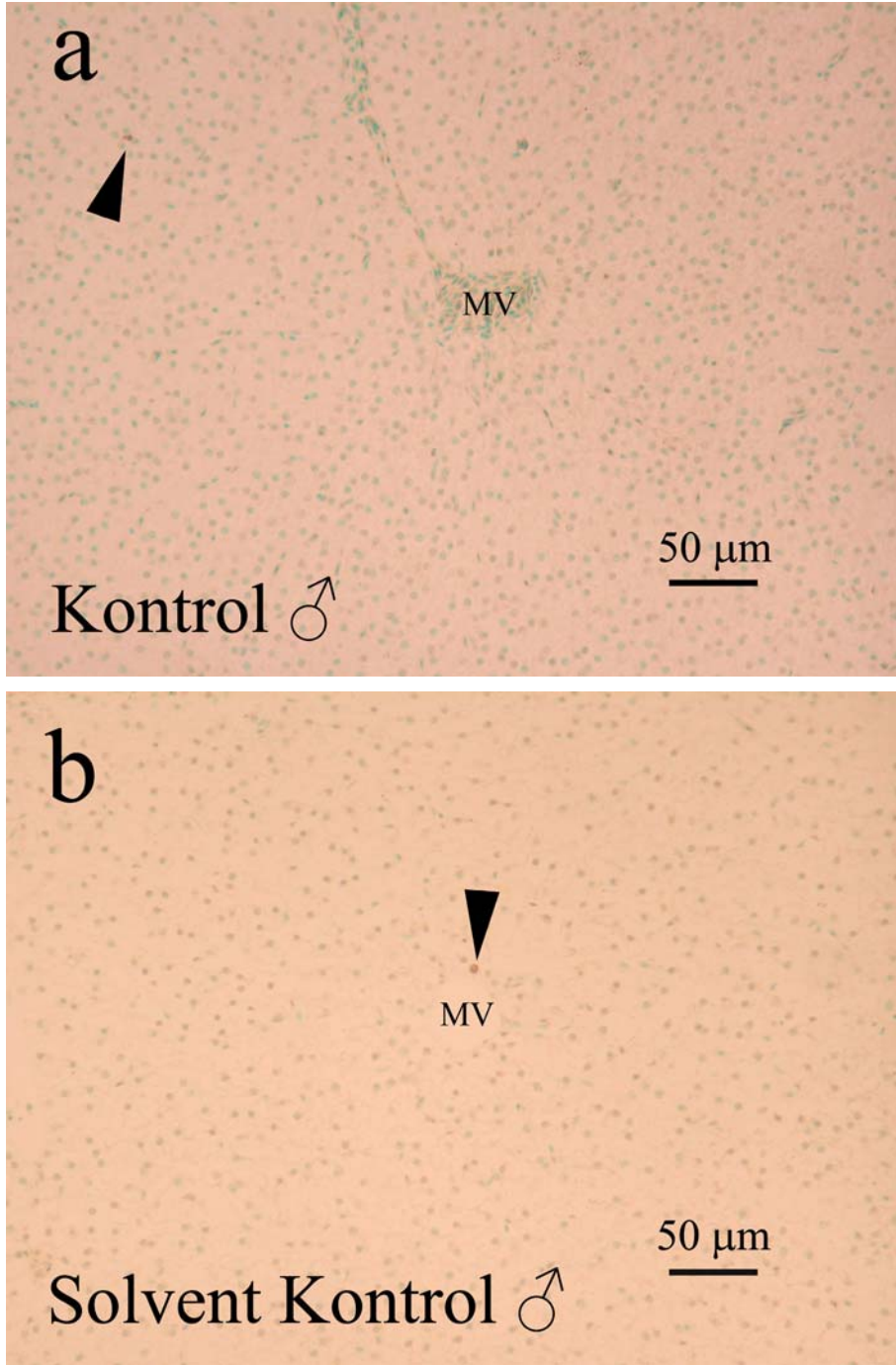
Şekil 4.9a,b. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefalinin ovaryumunda, stromal dokuda kalınlaşma (fibrozis), (*: atretik oosit; ok başları: fibrotik alanlar; Mallory trikrom).



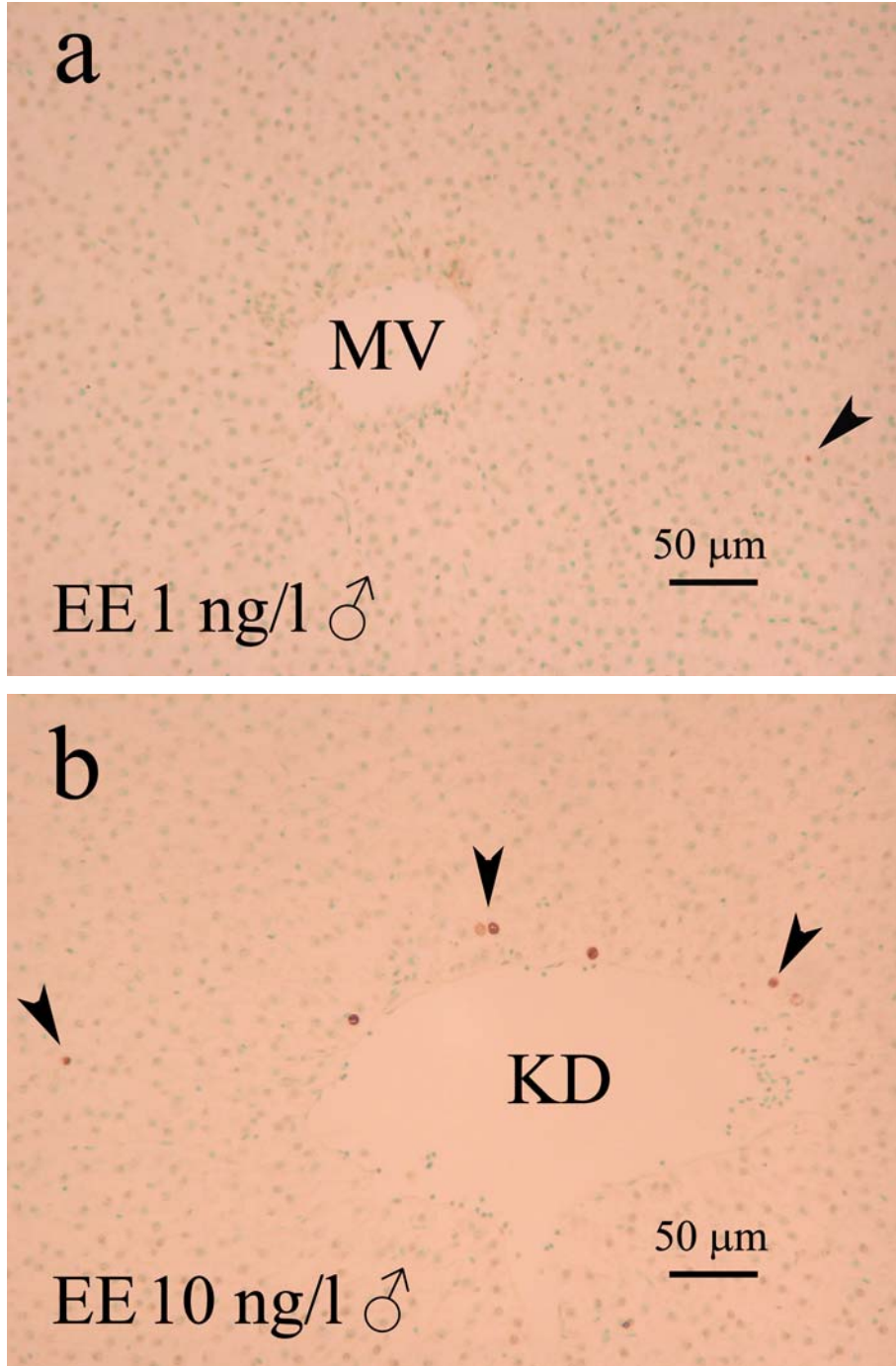
Şekil 4.9c. NP'nin 200 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi inci kefali ovaryumunda, stromal dokuda kalınlaşma (fibrozis), (*: atretik oosit; ok başları: fibrotik alanlar; Mallory trikrom).



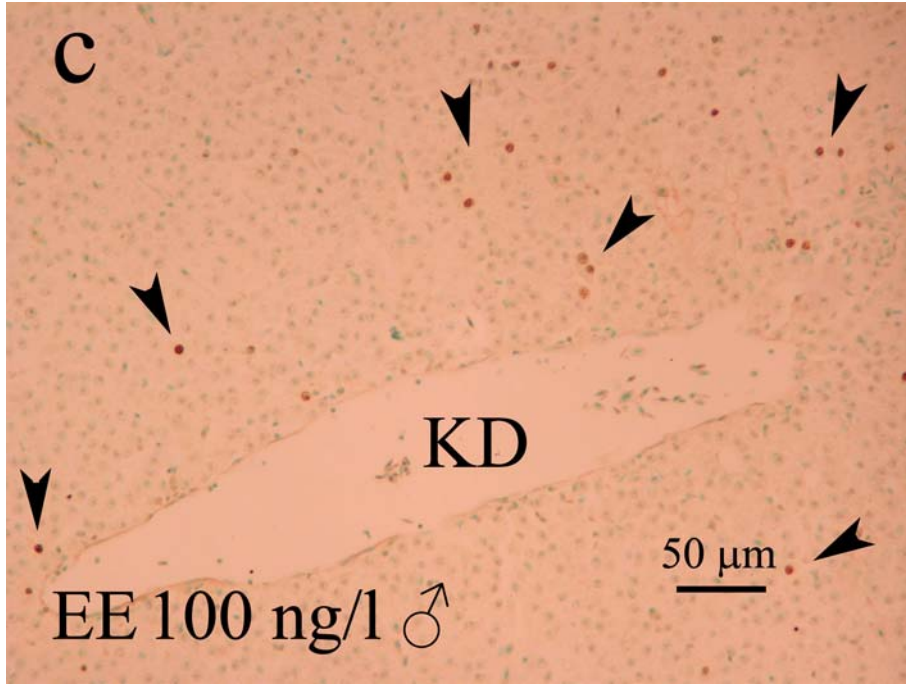
Şekil 4.10a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 200 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryumundan alınan kesitlerde stromal dokudaki apoptotik hücreler (ok başları), (TUNEL).



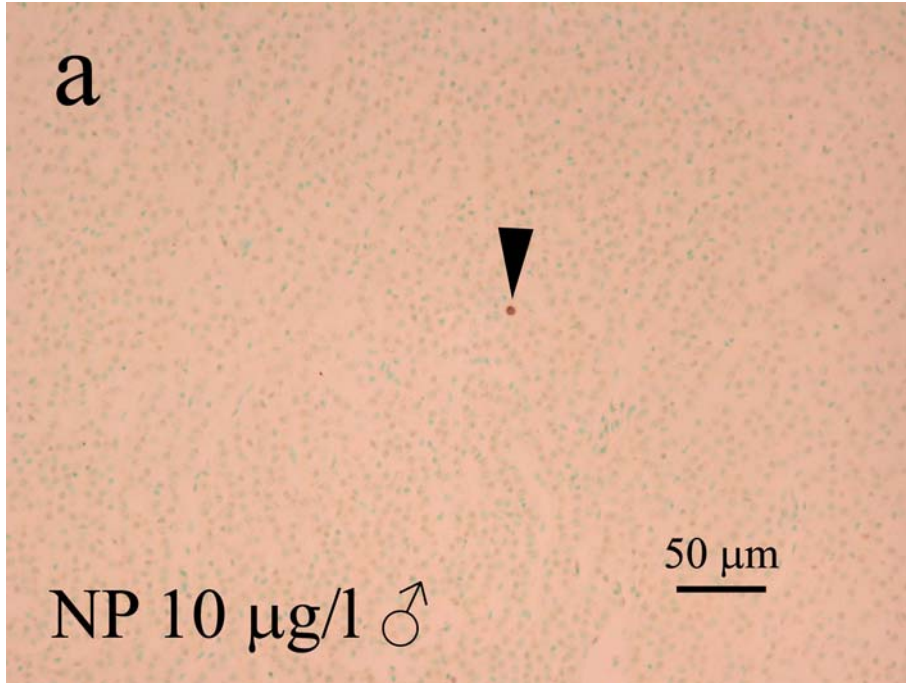
Şekil 4.11a,b. Erkek inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait karaciğer dokusunun, TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven).



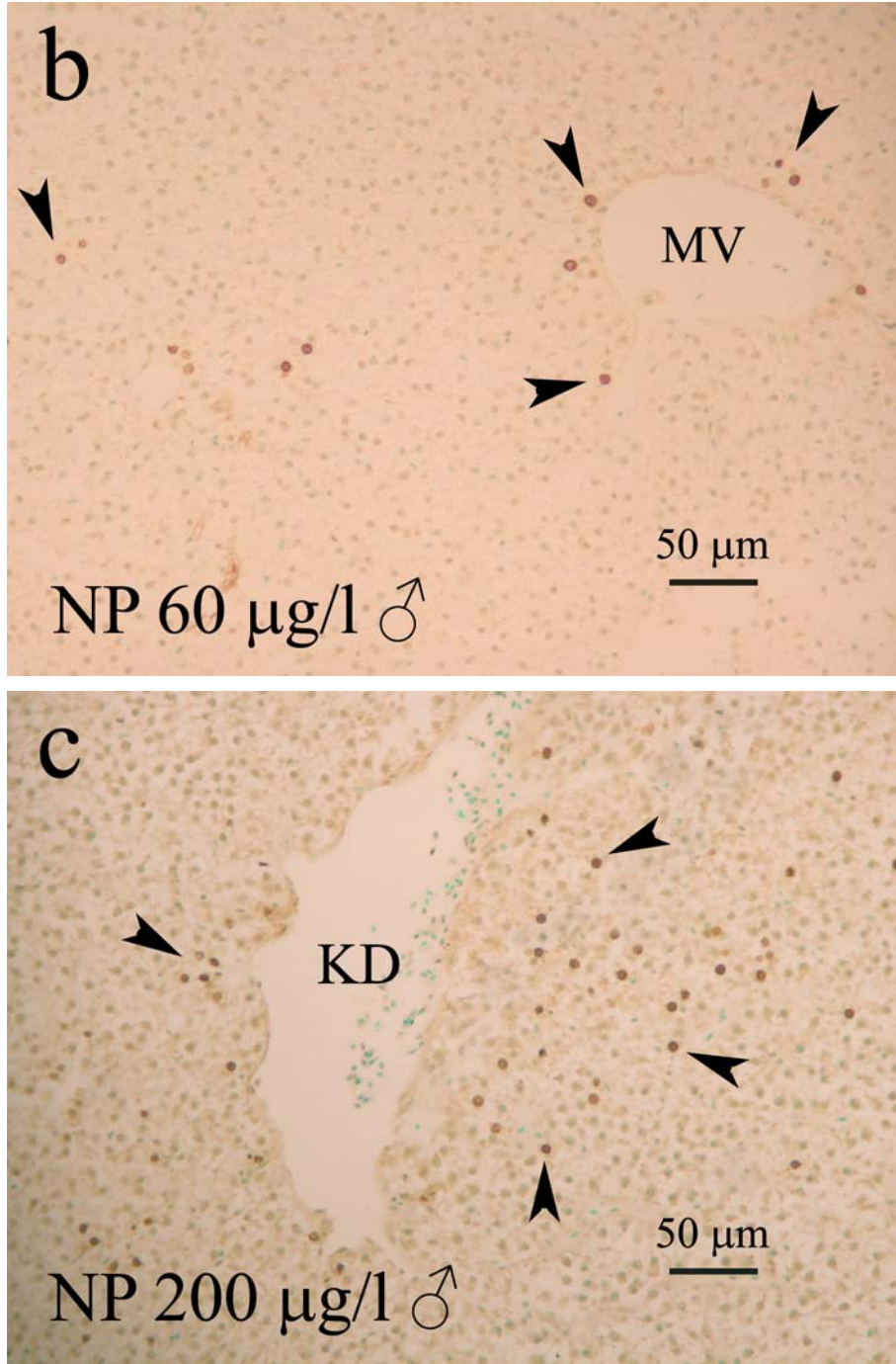
Şekil 4.12a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; KD: kan damarı).



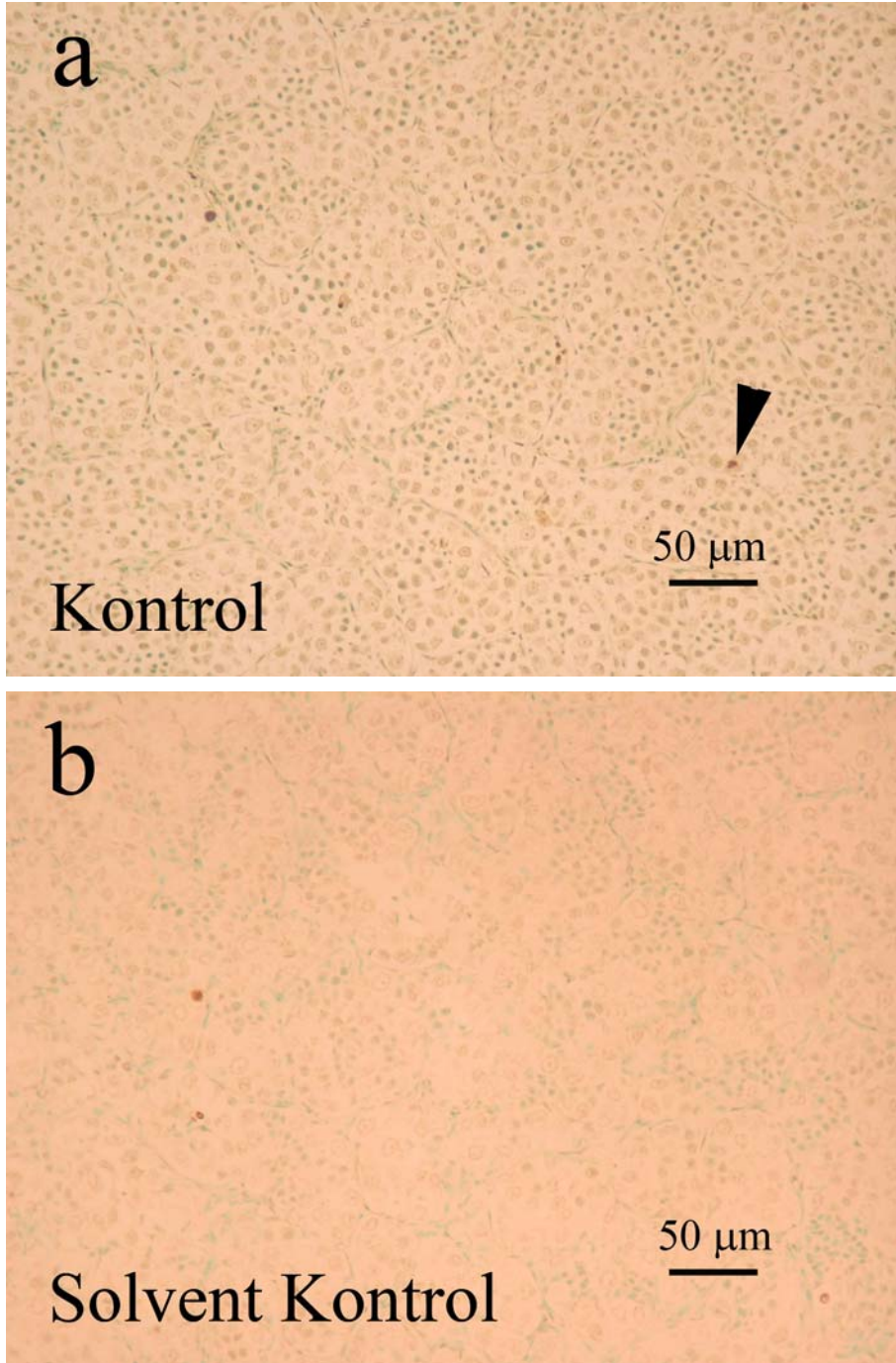
Şekil 4.12c. EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik hepatositler; KD: kan damarı).



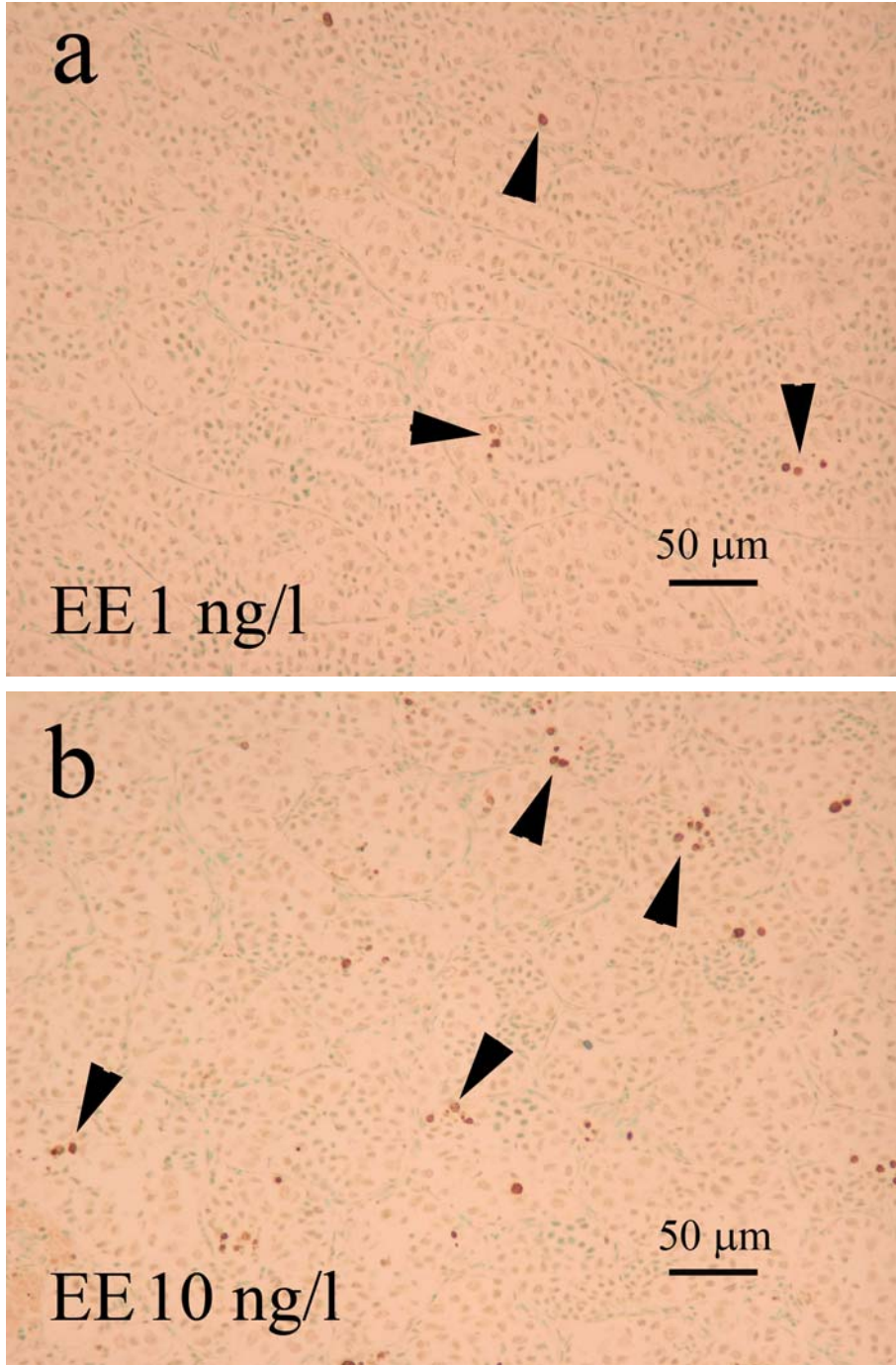
Şekil 4.13a. NP'nin 10 μg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başı: apoptotik hepatosit).



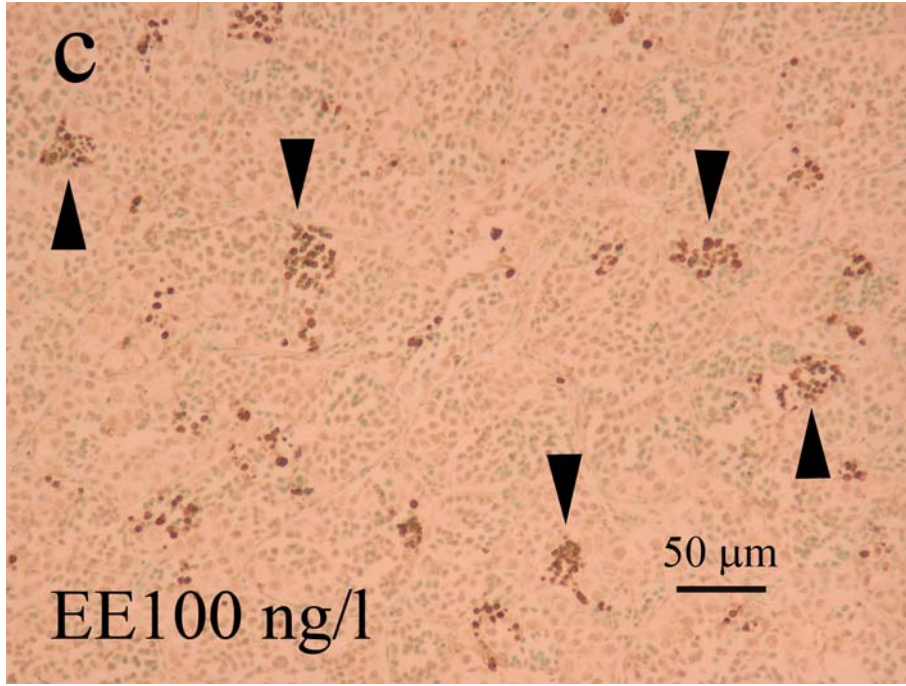
Şekil 4.13b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, karaciğer dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik hepatositler; MV: merkezi ven; KD: kan damarı).



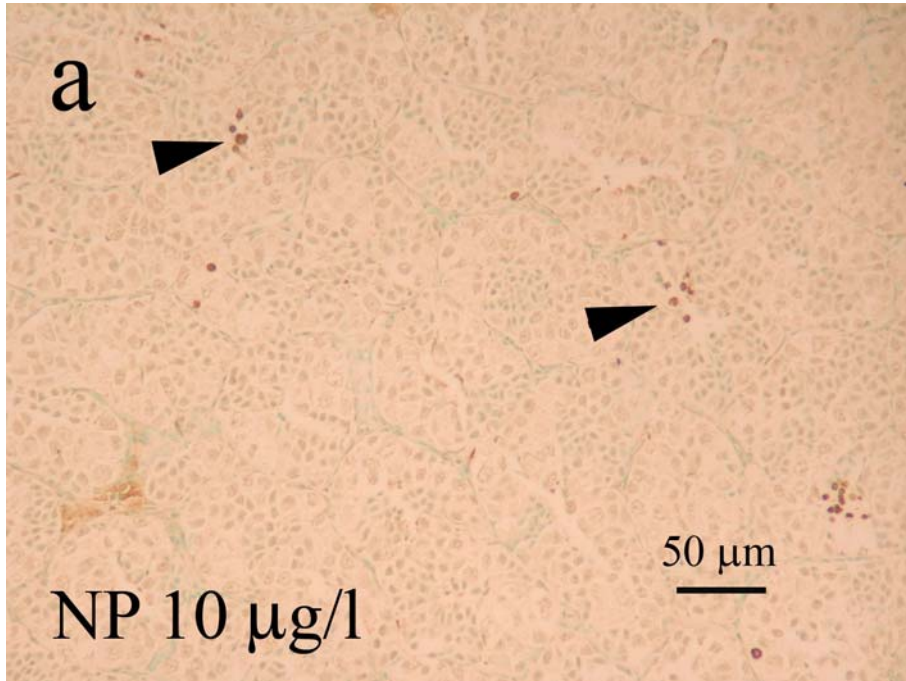
Şekil 4.14a,b. Erkek inci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) gruplarına ait testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başı: apoptotik germ hücresi).



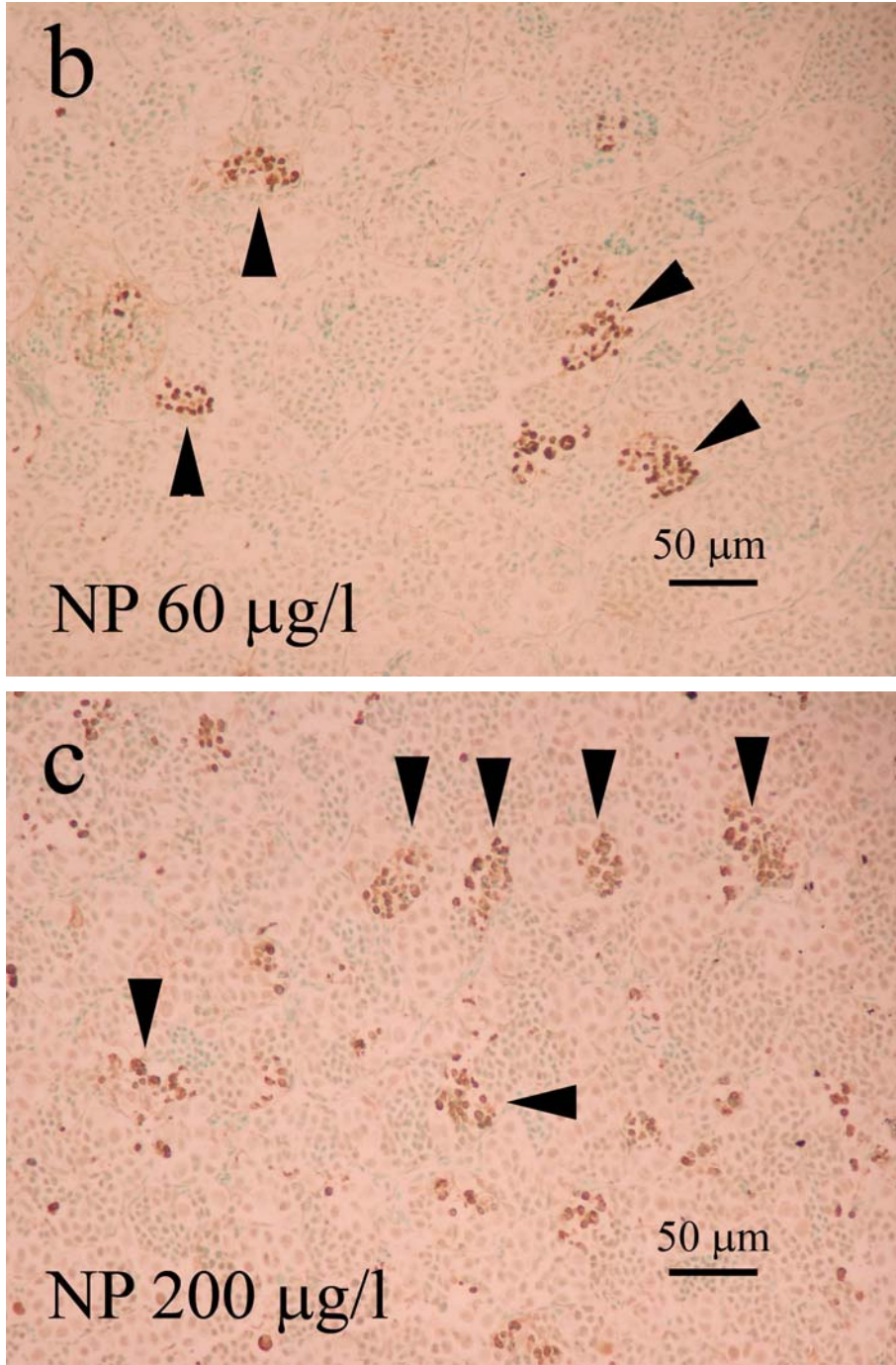
Şekil 4.15a,b. EE'nin 1 ng/l (a) ve 10 ng/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri).



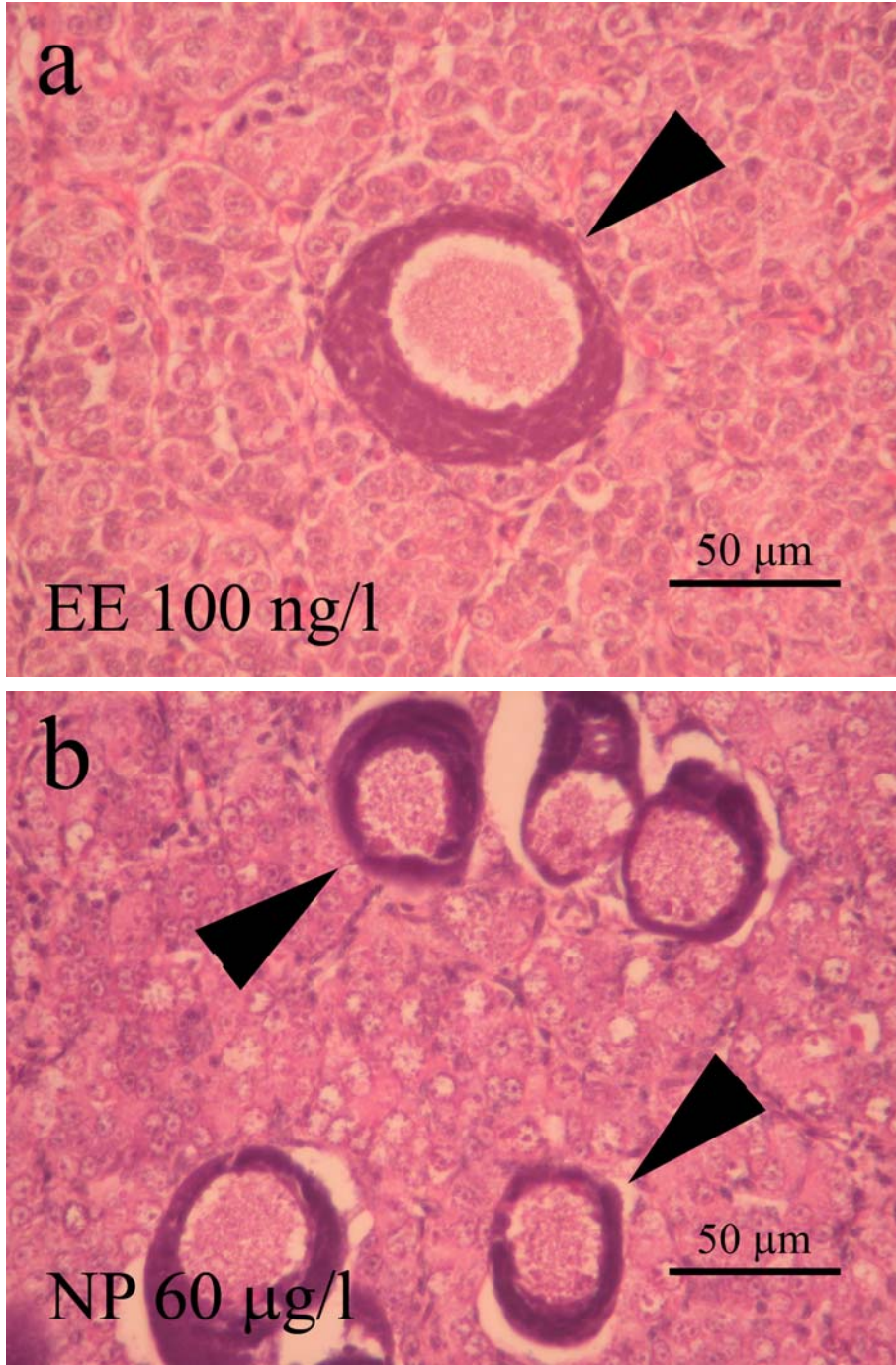
Şekil 4.15c. EE'nin 100 ng/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri).



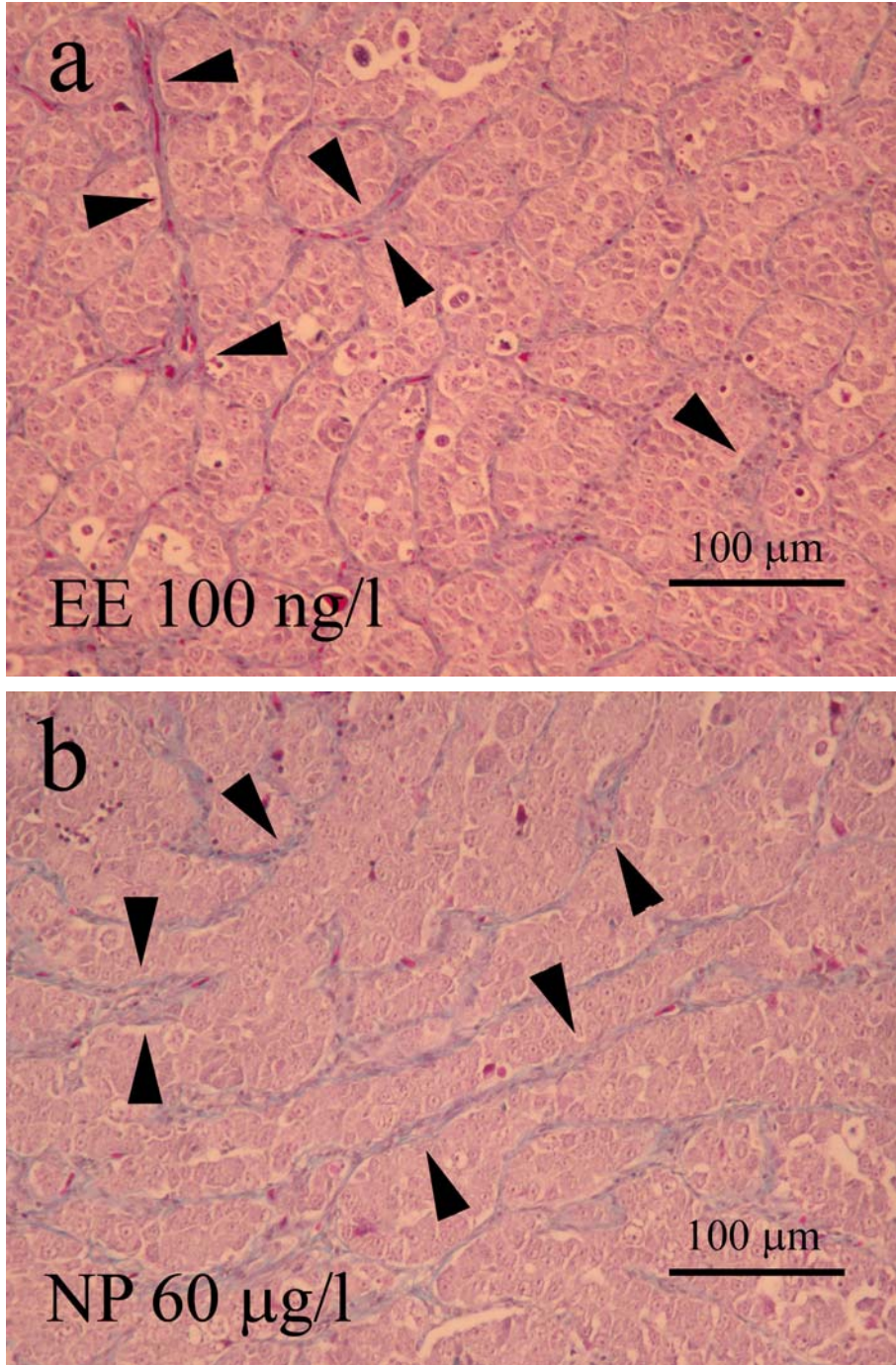
Şekil 4.16a. NP'nin 10 μg/l (a) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesiti, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri).



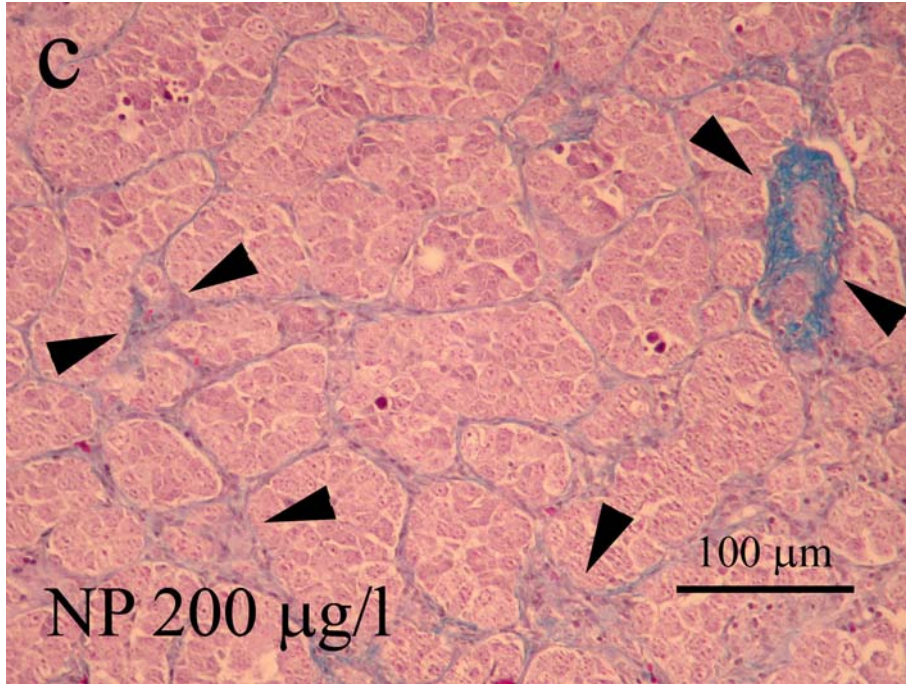
Şekil 4.16b,c. NP'nin 60 µg/l (b) ve 200 µg/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testis dokusunun TUNEL ile boyanmış histolojik kesitleri, (Ok başları: apoptotik germ hücreleri).



Şekil 4.17a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste ovotestis oluşumu, (Ok başları: perinuklear oositler; Hematoksilen eozin).



Şekil 4.18a,b. EE'nin 100 ng/l (a) ve NP'nin 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste intersititiyal doku kalınlaşması (fibrozis), (Ok başları; Mallory trikrom).



Şekil 4.18c. NP'nin 200 µg/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan erkek inci kefalinde, testiste intersititiyal doku kalınlaşması (fibrozis), (Ok başları; Mallory trikrom).

4.3. CYP1A enziminin hepatositlerdeki immunohistokimyası

Kontrol gruplarında, CYP1A immunboyanmasının hepatosit nukleus zarının hemen üzerindeki (perinüklear) alanlarda olduğu gözlemlendi ancak sitoplazmik alanda meydana gelmediği gözlemlendi bununla birlikte hepatositlerin sinüzoide bakan plazma membranı altında da boyanmanın olduğu belirlendi (Şekil 4.19a,b).

NP'ye maruz bırakılan gruplarda ise boyanmanın kontrol gruplarına benzer olarak nukleus membranı etrafında ve hepatositlerin sinüzoide bakan plazma membranı altında olduğu belirlendi (Şekil 4.20a,b,c). Kontrol gruplarında ve NP'ye maruz bırakılan gruplarda hepatositlerde sitoplazmik alanda boyanma gözlemlenmedi.

EE'nin 1ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta da boyanmanın kontrol grubundakine benzer olduğu bununla birlikte bazı hücrelerde nukleus etrafındaki boyanmanın daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 21a). Bu gruba ait bir bireyde kısmen ve granüllü boyanmanın meydana geldiği belirlendi. EE'nin 10 ng/l konsantrasyonuna

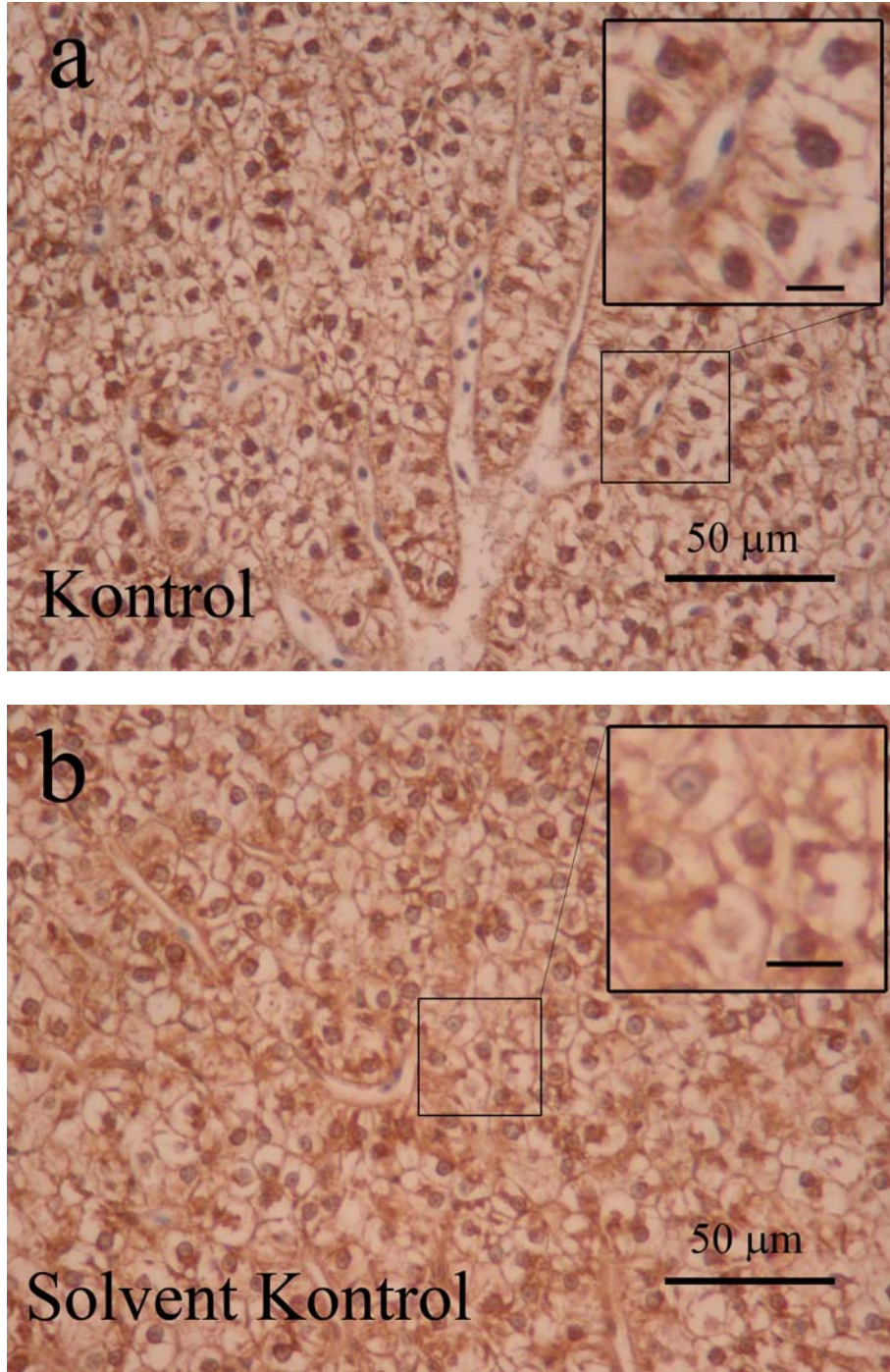
maruz bırakılan grupta genel olarak sitoplazmik alandaki boyanmanın kısmen (+) ve orta şiddetli (++) olduğu bununla birlikte az sayıdaki hücrede sitoplazmik alanın büyük oranda ve orta şiddetli boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.21b). EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan grupta sitoplazmik alanın genel olarak, nukleus membranından başlamak üzere, yaygın olarak büyük oranda (++) ve orta şiddetli (++) boyandığı, seyrek de olsa bazı hücrelerin tamamen ve orta şiddetli boyandığı belirlendi. Hücrelerdeki boyanmanın sinüzoid ve komşu hücrelere bakan yanal sitoplazmik bölgelerde meydana geldiği ancak sinüzoidin karşı tarafındaki bölgenin boyanmadığı gözlemlendi (Şekil 4.21c). Bu gruba ait iki bireyde hücrelerde sitoplazmik alanın tamamen ve orta şiddetli boyandığı, seyrek olarak bazı hücrelerde ise boyanmanın kuvvetli olduğu görüldü. EE'ye maruz bırakılan gruplarda sitoplazmik boyanma alanının konsantrasyon artışına paralel olarak arttığı ve orta şiddetli bir boyanma meydana geldiği belirlendi. Hepatositlerde CYP1A enzimi ile boyanan hücrelerin homojen dağılım gösterdiği yani kesit içinde merkezi ven veya büyük damarlar etrafında yoğunlaşmadığı gözlemlendi.

NP ve EE'ye maruz bırakılan inci kefalinde karaciğerinde CYP1A enziminin immunohistokimyasal değerlendirilmesi Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir.

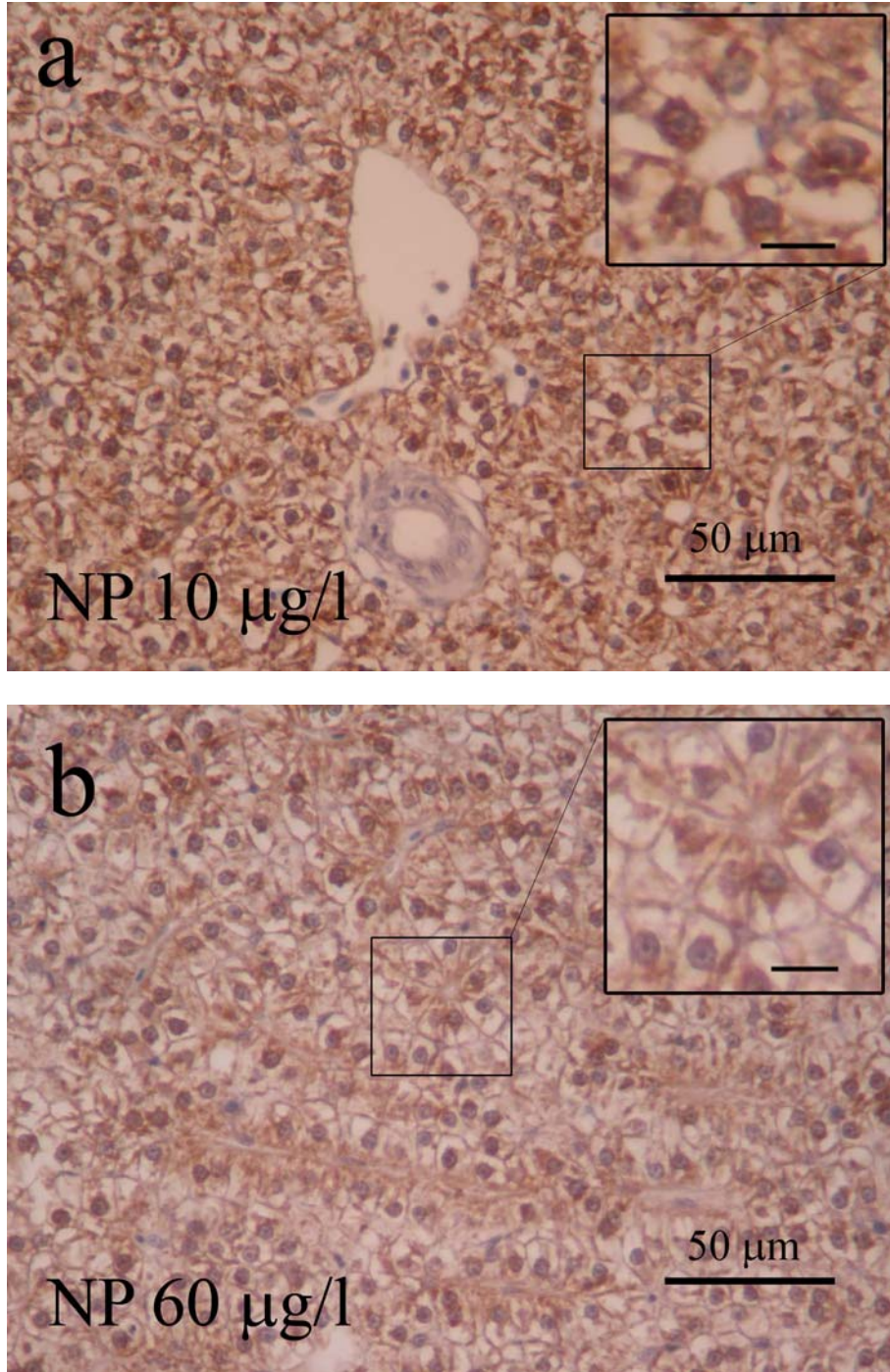
Çizelge 4.3. NP ve EE'ye maruz bırakılan inci kefalinde CYP1A enziminin hepatositlerdeki immunohistokimyasal değerlendirilmesi

Uygulama Grubu	n	1	2	3
Kontrol	6	-	-	a
Solvent Kontrol	6	-	-	a
NP 10 µg/l	6	-	-	a
NP 60 µg/l	6	-	-	a
NP 200 µg/l	6	-	-	a
EE 1 ng/l	6	-	-	a
EE 10 ng/l	6	+ / + +	++	a
EE 100 ng/l	6	++	++	a

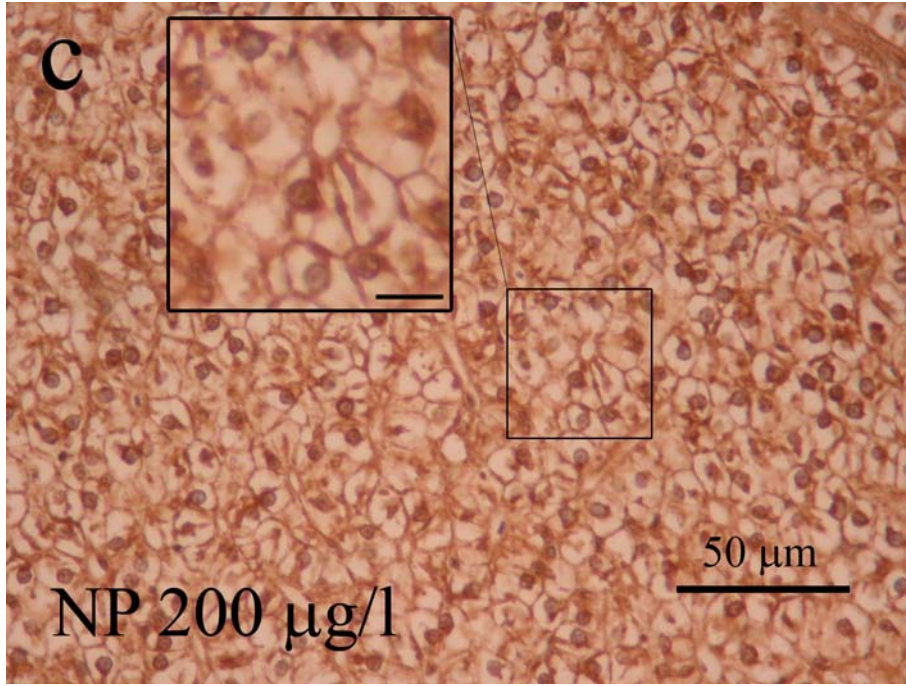
n: Birey sayısı, 1: Hücrenin sitoplazmik alanının boyanmanın dağılımına göre: Sitoplazmik alanda boyanma yok ise, (%0, -); sitoplazmik alanda yarıyarıya boyanma varsa (%50, +), sitoplazmik alanda büyük oranda boyanma varsa (%80-90, ++), sitoplazmik alan tamamen boyanmış ise (%100, +++). 2: Sitoplazmik alandaki boyanmanın yoğunluğuna göre: Negatif, (-); hafif şiddetli(+), orta şiddetli (++) , kuvvetli (+++) ve çok kuvvetli (++++). 3: 1. ve 2. kriterlere göre incelenen hücrelerin kesitteki dağılımına göre: Homojen, (a); heterojen, (b).



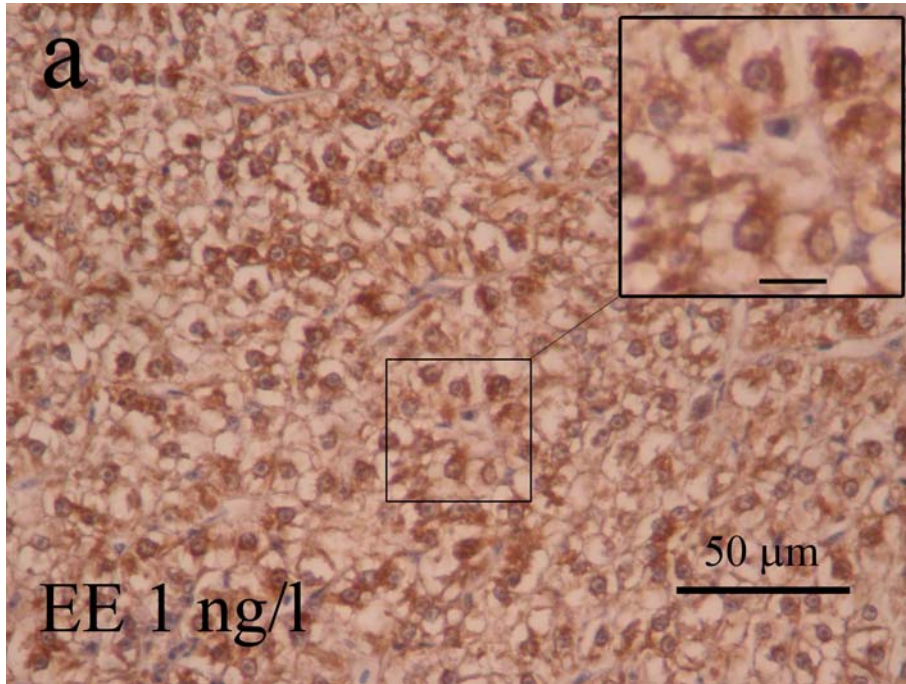
Şekil 4.19a,b. İnci kefalinde kontrol (a) ve solvent kontrol (b) grubu bireylerinin karaciğer dokusundan alınan kesitlerde CYP1A enzimine ait immun boyama. CYP1A immunreaksiyonu hepatositlerin sadece perinükleer alanlarında gözlenirken; sitoplazmik alanlarında gözlenmedi (iç kare bar: 10 µm).



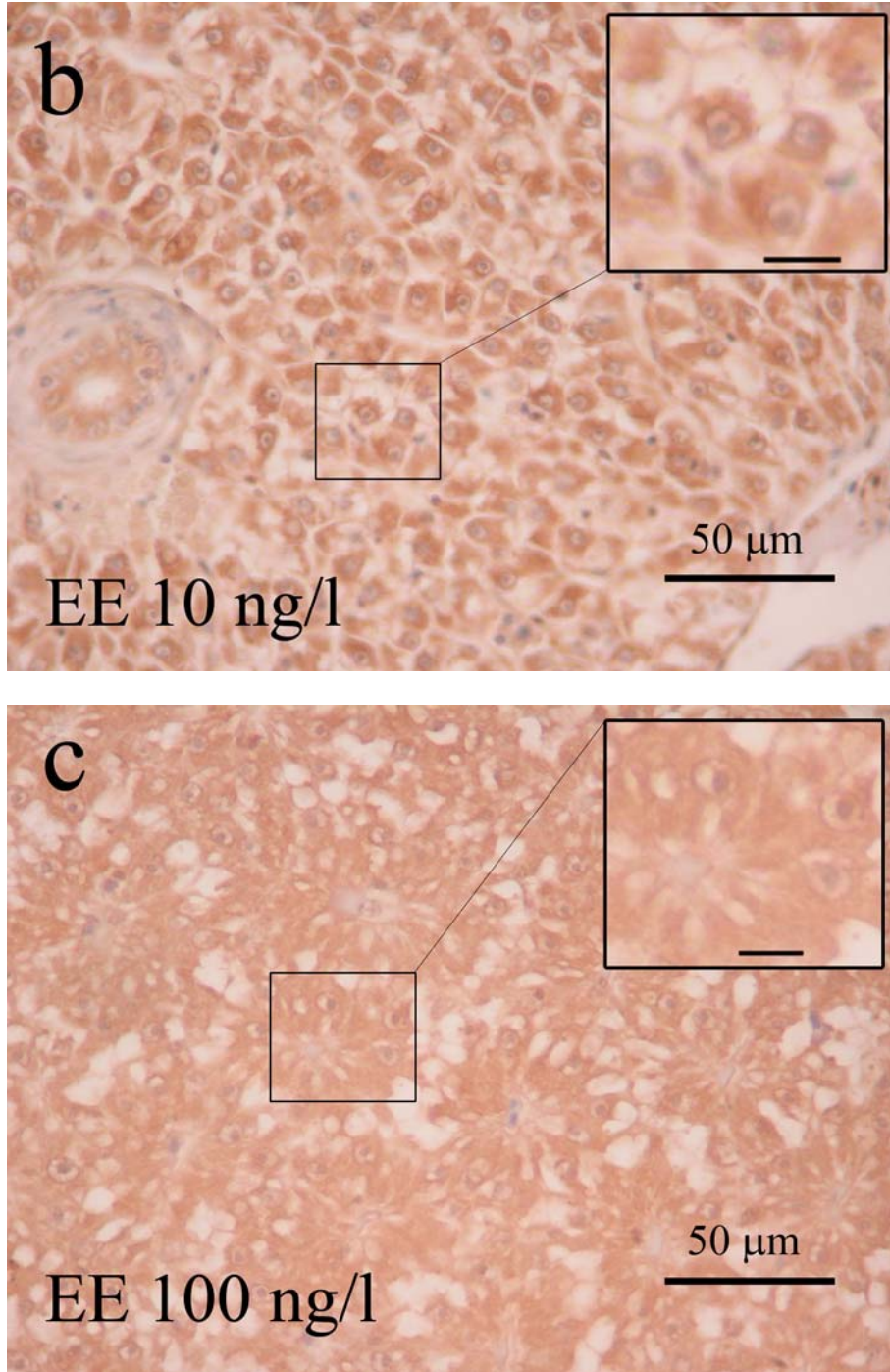
Şekil 4.20a,b. NP'nin 10 µg/l (a) ve 60 µg/l (b) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde CYP1A immün boyaması. Her iki konsantrasyonda da hepatositlerin, kontrollere benzer olarak sadece perinükleer alanda CYP1A immün reaksiyonu gözlenirken; sitoplazmik alanda gözlenmedi (iç kare bar: 10 µm).



Şekil 4.20c. NP'nin 200 µg/l (c) konsantrasyonuna maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitinde CYP1A immunboyaması. Kontrollere benzer olarak sadece hepatositlerde perinükleer alanda CYP1A immün reaksiyonu gözlenirken; sitoplazmik alanda gözlenmedi (iç kare bar: 10 µm).



Şekil 4.21a. EE'nin 1 ng/l konsantrasyonuna maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitinde hepatositlerde perinükleer alanda gözlenen CYP1A immün reaksiyon (iç kare bar: 10 µm).



Şekil 4.21b,c. EE'nin 10 ng/l (b) ve 100 ng/l (c) konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefaline ait karaciğer kesitlerinde, hepatosit sitoplazmasında gözlenen CYP1A immün reaksiyonu (iç kare bar: 10 µm).

4.4. Plazma 17 β -östradiol ve testosteron seviyeleri

Kontrol grupları, NP ve EE uygulanan gruplarda dişi ve erkek bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyeleri Çizelge 4.4'de gösterildi. Buna göre bütün bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyeleri minimum belirleme limitinin (20 pg/ml) üstünde bulundu. NP ve EE'nin bütün konsantrasyonlarında hem dişi hemde erkek bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişimin olmadığı belirlendi.

Çizelge 4.4. NP ve EE'ye maruz bırakılan dişi ve erkek inci kefalinde plazma 17 β -östradiol seviyeleri. Değerler Ort. \pm S.H. olarak ifade edildi

Uygulama Grubu	17 β -östradiol dişi (pg/ml)		17 β -östradiol erkek (pg/ml)	
	n	Ort. \pm S.H.	n	Ort. \pm S.H.
Kontrol	10	211.72 \pm 26.76	6	150.52 \pm 38.83
Solvent Kontrol	7	252.00 \pm 37.64	6	160.43 \pm 49.06
NP 10 μ g/l	10	168.81 \pm 28.41	6	101.43 \pm 21.15
NP 60 μ g/l	11	217.93 \pm 53.73	6	167.30 \pm 41.67
NP 200 μ g/l	11	152.79 \pm 18.66	5	205.54 \pm 51.22
EE 1 ng/l	11	201.70 \pm 29.21	5	223.00 \pm 54.90
EE 10 ng/l	8	186.41 \pm 27.93	5	136.00 \pm 24.30
EE 100 ng/l	12	302.17 \pm 29.95	5	196.20 \pm 23.25

n: Birey sayısı

Kontrol grupları, NP ve EE uygulanan gruplarda dişi ve erkek bireylerde plazma total T ölçümü sonucunda elde edilen veriler (T belirlenen birey sayısı (n_1), T belirlenemeyen birey sayısı (n_2), ölçüm aralığı ve ölçüm yapılabilen bireylerdeki T seviyeleri) dişi bireyler için Çizelge 4.5'de, erkek bireyler için Çizelge 4.6'da verilmiştir. Buna göre, T ölçümü yapılan erkek bireylerin %52,3'ünde ve dişi bireylerin ise %18,1'inde plazma total T seviyesinin minimum belirleme limitinin (20 ng/dl) üstünde olduğu belirlendi. Bununla birlikte, kontrol gruplarında (kontrol+solvent

kontrol) total T konsantrasyonlarının erkek bireylerin %75'inde, dişi bireylerin ise %29,4'ünde minimum belirleme limitinin (20 ng/dl) üstünde olduğu belirlendi. Bazı gruplarda plazma total T seviyesi belirlenebilen birey sayısının çok düşük olması ya da hiç olmaması, ANOVA gibi gruplar arası kıyaslama yapmaya olanak veren istatistiksel analiz yönteminin kullanımına izin vermediğinden gruplar arası kıyaslama, plazmada T seviyesi belirlenme ve belirlenmeme durumuna göre Ki kare testi ile yapıldı. Buna göre EE'nin 10 ve 100 ng/l konsantrasyonlarına ve NP'nin 200 µg/l konsantrasyonuna maruz bırakılan gruplardaki dişi bireylerin tamamında plazma T seviyesinin belirlenemediği gözlemlendi (Çizelge 4.5). NP'nin 200 µg/l konsantrasyonunda ve EE'nin 100 ng/l konsantrasyonlarındaki bütün bireylerde plazma T seviyesinin belirlenememesinin, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.05$) (Çizelge 4.5). Bununla birlikte NP ve EE uygulanan diğer konsantrasyonlardaki dişi bireylerde, plazma T seviyesinin belirlenememe durumunun kontrol grubu ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. NP ve EE uygulanan erkek bireylerde plazma total T seviyesinin belirlenememe durumu göz önüne alındığında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi. Bununla birlikte EE'nin 10 ng/l konsantrasyonunda plazma T seviyesi bir bireyde belirlenirken dört bireyde belirlenemedi. EE'nin 100 ng/ konsantrasyonunda ise hiçbir bireyde plazma T seviyesinin belirlenemediği gözlemlendi (Çizelge 4.6). EE'ye 100 ng/l konsantrasyonda maruz bırakılan grupta bütün bireylerde T seviyesinin belirlenememe durumu kontrol grubu ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlam yönünde bir eğilimin olduğu bulundu ($P = 0.06$).

Çizelge 4.5. NP ve EE uygulanan gruplarda dişi bireylerin plazma total T ölçümü sonucunda elde edilen veriler

Uygulama Grubu	Testosteron Dişi				
	n	n ₁	n ₂	ÖA (ng/dl, min.- mak.)	T (Ort.± S.H.)
Kontrol	10	4	6	<20-51.00	34.1±6.15
Solvent Kontrol	7	1	6	<20-83.60	83.6
NP 10 µg/l	10	4	7	<20-104.60	54.25±17.27
NP 60 µg/l	11	3	8	<20-126.20	88.70±25.94
NP 200 µg/l	12	0	11	<20*	-
EE 1 ng/l	12	2	10	<20-37.20	35.60±1.60
EE 10 ng/l	8	0	8	<20	-
EE 100 ng/l	12	0	12	<20*	-

n: Ölçüm yapılan toplam birey sayısı; n₁: Testosteron belirlenen birey sayısı; n₂: Testosteron belirlenemeyen birey sayısı; ÖA: ölçüm aralığı; T: Testosteron belirlenen bireylerde testosteron seviyelerinin Ort.± S.H. değerleri; *: Ki kare testine göre $P < 0.05$.

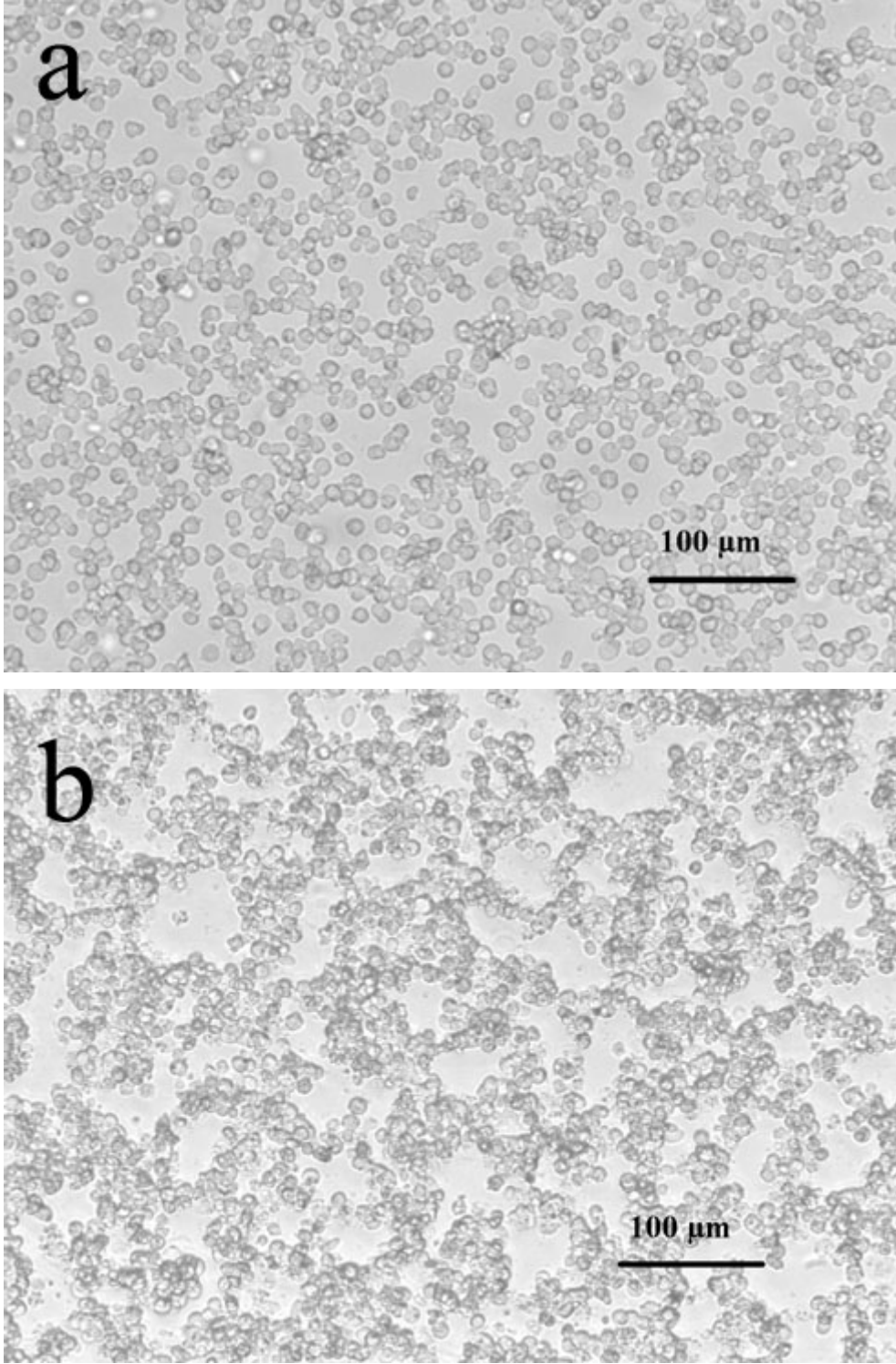
Çizelge 4.6. EE ve NP uygulanan gruplarda erkek bireylerin plazma total T ölçümü sonucunda elde edilen veriler

Uygulama Grubu	Testosteron Erkek				
	n	n ₁	n ₂	ÖA (ng/dl, min.-mak.)	T (Ort.± S.H.)
Kontrol	6	4	2	<20-91.60	62.80±11.80
Solvent Kontrol	6	5	1	<20-100.40	58.68±12.36
NP 10 µg/l	6	3	3	<20-41.90	31.83±5.92
NP 60 µg/l	6	4	2	<20-222.00	105.23±34.10
NP 200 µg/l	5	2	3	<20-131.20	110.00±21.20
EE 1 ng/l	5	4	1	<20-69.80	56.45±8.21
EE 10 ng/l	5	1	4	<20-74.00	74.00
EE 100 ng/l	5	0	5	<20*	-

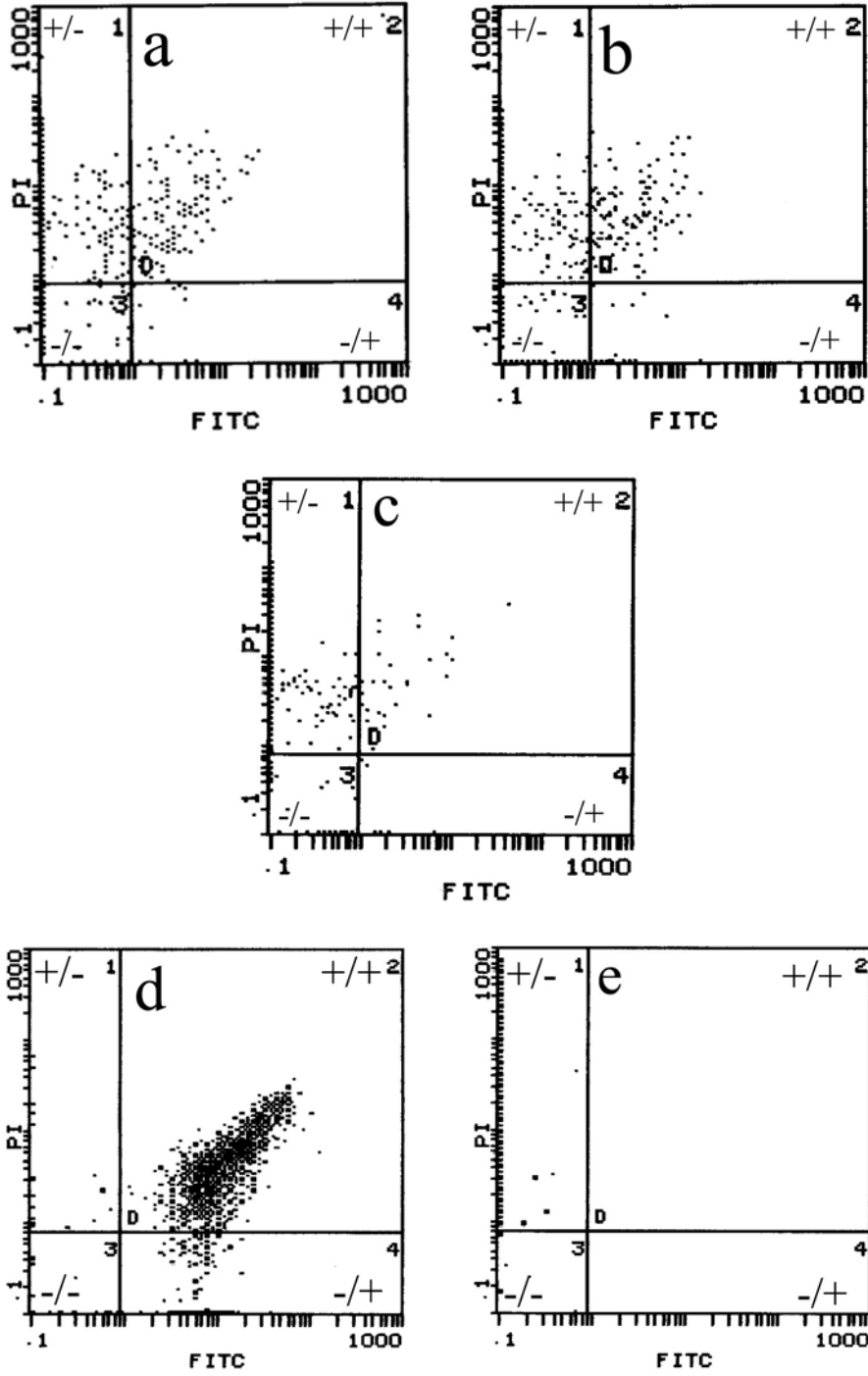
n: Ölçüm yapılan toplam birey sayısı; n₁: Testosteron belirlenen birey sayısı; n₂: Testosteron belirlenemeyen birey sayısı; ÖA: Ölçüm aralığı; T: Testosteron belirlenen bireylerde testosteron seviyelerinin Ort. ± S.H. değerleri; *: Ki kare testine göre P = 0.06.

4.5. Hücre kültürü

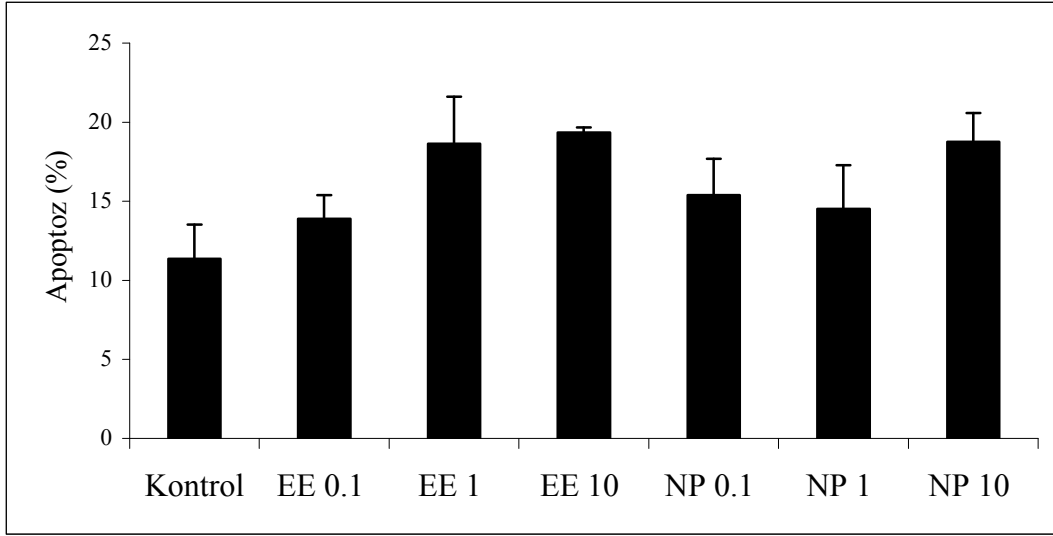
Kültüre alınan inci kefali karaciğer hücrelerinin, kültür başlangıcından 24 saat sonra sinüzoid benzeri dizilim gösterdiği gözlemlendi. Karaciğer hücrelerinin kültürden hemen sonraki (0 saat) ve 24 saat sonraki görüntüleri Şekil 4.22a,b'de gösterilmiştir. EE ve NP'ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefali karaciğer hücrelerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantifikasyonu TUNEL metodu ile işaretlenen hücrelerin flow (akım) sitometride ölçümü sonucunda gerçekleştirildi (Şekil 4.23). EE ve NP'ye maruz bırakılan karaciğer hücrelerinde meydana gelen apoptoz yüzdesinde artış gözlenmesine rağmen bu artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.22a,b. İnci kefalinde kültüre alınan karaciğer hücrelerinin görüntüleri. a) Kültüre alındıktan hemen sonra, b) Kültüre alındıktan 24 saat sonra.



Şekil 4.23. EE (a) ve NP'nin (b) $10 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefalı karaciğer hücrelerinde, kontrol grubu hücrelerinde (c), pozitif kontrol hücrelerinde (d) ve negatif kontrol hücrelerinde (e), TUNEL-PI çift boyanan apoptotik hücrelerin flow sitometrik analizi sonucunda elde edilen histogramlar. Histogramlarda sağ üst kareler, apoptotik hücreleri (+/+; PI^+ / FITC^+); sol üst kareler apoptotik olmayan hücreleri, (+/-; PI^+ / FITC^-); sol alt kareler boyanmayan yapıları, (-/-; PI^- / FITC^-); sağ alt kareler ise artefekt yapılarını (-/+; PI^- / FITC^+), göstermektedir.



Şekil 4.24. EE ve NP'ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefalı karaciğer hücrelerinde apoptoz yüzdesi. Değerler her grup için birbirinden bağımsız üç deneyin ($n = 3$) Ort. \pm S.H.'sı olarak ifade edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Apoptoz ve gonad histopatolojisi

Bu çalışmada EE ve NP'ye maruz bırakılan inci kefalinde, karaciğer ve gonadlarda meydana gelen toksik etki apoptoz tayini ile değerlendirildi. Apoptoz canlılarda normal gelişim süreci içerisinde meydana gelen bir fizyolojik ölüm yolu olmasına karşılık patolojik olarak da uyarılabilen ve zenobiyotik stresine ilişkin bilgi veren faydalı bir biyomarkırdır (Sweet ve ark., 1999). İnci kefalinde NP ve EE'nin erkek ve dişi bireylerin karaciğer ve gonadlarında apoptotik ölümü uyardığı gözlemlendi. Weber ve ark. (2002), NP'nin erkek *Oryzias latipes*'in testiste germ hücrelerinde apoptozu uyardığını, ancak karaciğerde hepatosit ölümünde önemli bir etkiye neden olmadığını bildirmişlerdir. Apoptozun bir biyomarkır olarak kullanıldığı başka bir çalışmada ise EE'ye maruz bırakılan *Oryzias latipes*'in dişi ve erkek bireylerinde hepatosit apoptozunun uyarıldığı, bununla birlikte EE'nin spesifik olarak erkek bireylerin gonadlarında apoptotik ölüme neden olduğu gözlenmiştir (Weber ve ark., 2004).

Östrojenin karaciğer hücreleri için başlıca bir mitojen olduğu, karsinojenik farklılaşmaya uğrayan hücrelerin apoptoza hassaslaştığı ve apoptozun aşırı hücre artışının baskılanması için homeostatik bir mekanizma olduğu ifade edilmiştir (Columbano ve Shinozuka, 1996). EE'ye maruz bırakılan ovaryumektomik sıçanlarda, karaciğerde tümör oluşumunun arttığı, östrojen reseptör seviyelerinin yükseldiği ve yeni hepatosit popülasyonlarında artışın meydana geldiği, (Vickers ve Lucier, 1991), dietilstilbestrol (DES), 17 β -ösradiol ve bisfenol A'ya maruz bırakılan V79 hücrelerinde mitotik indeks artışı, kromozomlarda değişim ve anöploidi ile birlikte uyarılan multipolar bölünmenin meydana geldiği bildirilmiştir (Ochi, 1999). Apoptoz, embriyonik morfogenez, metamorfoz ve hormon uyarımlı dokuların şekillenmesi gibi temel biyolojik olaylarda rol oynayan hücre ölüm yoludur (Schwartzman ve Cidlowski, 1993) bununla birlikte DNA hasarına ve mitoza karşı homeostatik bir mekanizmadır (Norbury ve Zhivotovsky, 2004) ve zenobiyotikler için karaciğerde faydalı bir

biyomarkırdır (Piecchota ve ark., 1999). Bu çalışmada karaciğer dokusundaki EE ve NP'nin apoptozu uyarıcı etkisi, yukarıda sözü edilen östrojen ve zenoöstrojenlerin karaciğerde oluşturdukları kromozom değişimleri, mitotik artış, DNA hasarı gibi olumsuz etkilerin sonucunda hücrelerin apoptoza hassaslaşmasından veya apoptozun mitoza zıt etkisinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada güçlü bir sentetik östrojen olan EE'ye maruz bırakılan hem dişi hem de erkek bireylerde, hepatositlerde apoptotik hücre ölümünün konsantrasyon artışı ile birlikte arttığı, bu artışın 100 ng/l konsantrasyonda anlamlı olduğu belirlendi. Benzer olarak Weber ark., (2004) da, EE'ye yumurta açılımından cinsel olgunluğa ulaşincaya dek altı ay süreyle maruz bıraktıkları *Oryzias latipes*'te, erkek ve dişi bireylerde TUNEL pozitif hepatositlerin önemli şekilde arttığını ve EE'nin her iki cinsiyette hepatotoksik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. EE'ye bağlı hepatik toksisite *Cyprinodon variegatus*'ta da gözlenmiştir (Zillioux ve ark., 2001). Bu bulgularla uyumlu olarak inci kefalinde de EE'ye bağlı olarak artan hepatosit ölümü, EE'nin bu balıkta da hepatotoksik etkiye sahip olduğunu gösterir.

İnci kefalinde EE'ye maruz bırakılan gruplardaki bulgulara paralel olarak NP'ye maruz bırakılan dişi ve erkek bireylerde hepatosit hücre ölümünün konsantrasyona artışına paralel olarak arttığı ve bu artışın NP'nin en yüksek konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Weber ve ark., (2002), NP'nin 100 ppb konsantrasyonuna maruz bıraktıkları olgun erkek *Oryzias latipes*'te, karaciğerde apoptozun artışında bir eğilim olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulgularından farklı olarak erkek inci kefali karaciğerinde NP'nin 200 µg/l konsantrasyonunda görülen apoptotik etki, uygulanan kimyasalın konsantrasyonundan ve türler arası farklılıktan kaynaklanabilir. Aynı zamanda bu çalışmada da NP'nin 60 µg/l'lik konsantrasyonunda erkek ve dişi bireylerde hepatosit apoptozundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. NP'nin dişi balıklarda karaciğer hücre apoptozu üzerine etkisi hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. İlk kez bu çalışmada, NP'nin dişi bireylerde de karaciğer hepatosit apoptozunu anlamlı olarak artırdığı açık bir şekilde belirlendi ($P<0.001$).

NP'nin *Onchorhyncus mykiss*'in karaciğerinde biriktiği aynı zamanda hücre sınırlarının kaybolmasına, hücre nükleuslarında büyümeye ve hepatosit sayısında

azalmaya neden olduğu (Uguz ve ark., 2003), EE ve NP'ye maruz bırakılan *Gobiocypris rarus*'ta erkek bireylerde karaciğer hücrelerinde hipertrofi ve hücresel yapılarda hasarın meydana geldiği (Zha ve ark., 2007), NP'ye ve OP'ye maruz bırakılan Dawley sıçanlarında ise apoptotik indekste ve binükleer hepatosit yüzdesinde artışın meydana geldiği (Hernández-Rodríguez ve ark., 2007) bildirilmiştir. Bu çalışmada da NP'nin dişi ve erkek bireylerde karaciğerde hücre ölümü artırması, diğer balıklarda ve memelilerde olduğu gibi NP'nin inci kefalı karaciğerinde de toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

İnci kefalinde, EE ve NP'ye maruz kalma sonucunda, karaciğerde artan TUNEL pozitif hepatositler, merkezi ven ve büyük damarlar etrafında yoğun olduğu gözlemlendi. Bu da dolaşım yolu ile karaciğere gelen bu toksik maddelerin bu bölgelerde etkili olduğunu göstermektedir.

EE'ye maruz bırakılan dişi inci kefalinde, ovaryum folikülü başına düşen apoptotik somatik hücre sayısında konsantrasyon artışı ile birlikte bir artışın olduğu ve bu artışın EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Bu konsantrasyonda, ovaryum folikül hücrelerindeki apoptotik ölümle uyumlu olarak, atretik oosit yüzdesinde de önemli bir artış gözlemlendi. Weber ve ark., (2004), yumurta açılımından olgunluk dönemine kadar 10 ng/l EE'ye maruz bırakılan *Oryzias latipes*'te, EE'nin dişi bireylerde ovaryum hücre ölümüne ve folikül atrezisine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte 10 ve 25 ng/l EE'ye 3, 12 ve 24 gün süre ile maruz bırakılan dişi zebra balığında (*Danio rerio*) zamana ve konsantrasyona bağımlı olarak GSI'nin düştüğü ve atretik oosit sayısının yükseldiği bildirilmiştir (Van Den Belt ve ark., 2002). Bu da EE'nin ovaryumdaki etkisinin uygulama konsantrasyonuna, süresine ve balığın türüne göre değişebileceğini göstermektedir.

EE'ye maruz bırakılan *Cyprinodoton variegatus*'ta ovaryumda atretik oosit sayısının arttığı (Zillioux ve ark., 2001), *Oryzias latipes*'te GSI değerinin düştüğü ve bırakılan yumurta sayısının azaldığı (Scholz ve Gutzeit, 2000), *Pimepahles promelas*'ta atretik oositlerin belirlendiği (Kidd ve ark., 2007), *Gobiocypris rarus*'ta ise GSI'nin düştüğü ve ovaryumların dejenere olduğu (Zha ve ark., 2007), bildirilmiştir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak EE'ye maruz bırakılan inci kefalinde ovaryum folikül

hücrelerinde ve stromal dokuda artan apoptoz ve % atretik oosit sayısındaki yükselme, bu kimyasalın ovaryum dokusu için toksik etkiye sahip olduğu gösterir.

Bu çalışmada, NP'nin 200 µg/l konsantrasyonda folikül hücresi apoptozunda önemli bir artışa neden olduğu belirlenirken, % atretik oosit sayısını konsantrasyon artışına paralel olarak artırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Literatürde NP'nin dişi bireylerde ovaryum folikül hücre apoptozu üzerine etkisi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. NP'nin *Puntius conchoni*'ta yumurta gelişiminde gecikmeye ve ovaryum foliküllerinde atreziye neden olduğu (Xiao ve ark., 2007) ve hermafrodit *Rivulus marmoratus*'ta oogenezi anlamlı bir şekilde inhibe ettiği belirlenmiştir (Tanaka ve Grizzle, 2002). NP'nin diğer balık türlerinde gözlenen bu olumsuz etkilerine paralel olarak, inci kefalinde de NP'ye maruz kalma sonucunda artan folikül hücre ölümü ve atretik oosit sayısındaki artma eğilimi NP'nin inci kefali ovaryum dokusu için olumsuz etkilere sahip olduğunu gösterir.

Ovaryum folikül hücre apoptozu, beyazlatılmış kağıt hamuru fabrikası atık suyuna maruz bırakılan *Catostomus commersoni*'de (Janz ve ark., 1997) ve metilcivaya maruz bırakılan *Pimephales promelas*'ta da (Drevnick ve ark., 2006) belirlenmiştir. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, EE ve NP'ye maruz bırakılan inci kefalinde de folikül hücre apoptozunun arttığı belirlendi.

EE ve NP'ye maruz bırakılan gruplarda oositler arasındaki stromal dokunun arttığı ve folikül hücrelerinin yanı sıra stromal dokudaki hücrelerde de apoptotik ölümün meydana geldiği gözlemlendi. Bu gözlem ovaryumda hücre ölümünün sadece folikül hücrelerinde değil diğer hücre tiplerinde de meydana geldiğini ve diğer hücrelerin de bu kimyasallara hassas olduğunu gösterir.

EE'nin inci kefali testisinde, intersititijel bağ dokusu kalınlaşmasına (fibrozis) ve ovotestise şekillenmesine neden olduğu belirlendi. Bu bulgularla uyumlu olarak, EE'ye maruz bırakılan *Cyprinodon variegatus*'ta fibrozis gözlenen birey sayısında ve fibrozisin şiddetinde artma ve spermatogonya sayısında ise azalmanın meydana geldiği (Zilloux ve ark., 2001), *Danio rerio*'da testis somatik indeksinin düştüğü ve spermatogenezin inhibe olduğu (Van Den Belt ve ark., 2002), *Pimephales promelas*'da ise spermatogenezde gecikme, fibrozis, tübül malformasyonları ve interseksin gözlemlendiği (Kidd ve ark., 2007) bildirilmiştir. EE'nin inci kefalinde neden

olduğu histopatolojik olumsuzlukların yanı sıra, testiste seminifer tübül başına düşen apoptotik germ hücre sayısının doz artışına paralel olarak arttığı ve bu artışın EE'nin en yüksek konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Benzer şekilde, Weber ve ark., (2004), *Oryzias latipes*'te de EE'nin Leydig, Sertoli, spermatozoid ve spermatid hücrelerinde apoptozu önemli bir şekilde artırdığını ve erkek bireylerde gonadal toksisiteye neden olduğunu bildirmişlerdir. Bunlarla uyumlu olarak, EE'nin inci kefalı testisinde de histopatolojik değişimlere ve üreme hücrelerinde apoptozu yol açarak toksik etkiye sahip olduğu söylenebilir.

NP'nin inci kefalinde spermatogonyal hücre apoptozunu belirgin bir şekilde uyararak germ hücre kaybına neden olduğu belirlendi. NP'ye maruz bırakılan *Onchorhynchus mykiss*'te testis gelişiminin inhibe olduğu (Jobling ve ark., 1996), *Zoarces viviparus*'ta seminifer lobüllerin dejenere olduğu, spermatozoa sayısının azaldığı ve sertoli hücrelerinde değişimin gözlemlendiği (Christiansen ve ark., 1998), *Puntius conchoni*'ta ise testiste germinal hücre kaybının meydana geldiği (Xiao ve ark., 2007) bildirilmiştir.

NP'ye maruz bırakılan *Oryzias latipes*'te başlıca spermatogonya ve spermatozoid hücrelerinde piknozis meydana geldiği gözlemlenmiştir. (Weber ve ark., 2003). NP'nin inci kefalinde, testiste apoptozu uyarıcı etkisine dayanılarak, üreme hücrelerinin NP'ye duyarlı olduğu söylenebilir. Weber ve ark., (2002), NP'ye maruz bırakılan *Oryzias latipes*'te Sertoli, Leydig homolog ve spermatidlerde gözlenen apoptozun altı kat arttığını ve lobüller arası bölgelerde fibrozisin gözlemlendiğini, Han ve ark., (2004) ise NP'nin erkek ratlarda testiste apoptotik hücre sayısını doza bağımlı olarak artırdığını ve patolojik değişimlere yol açtığını bildirmişlerdir. Uyumlu olarak bu çalışmada da, NP'ye maruz bırakılan erkek bireylerin testis dokusunda seminifer tübül başına düşen apoptotik germ hücre sayısında belirgin bir artış olduğu bununla birlikte, NP'nin 60 ve 200 µg/l konsantrasyonlarına ait birer bireyde seminifer tübüllerin intersititiyel dokusunda kalınlaşma (fibrozis) meydana geldiği gözlemlendi. Bu bulgular NP'nin inci kefalı testis dokusunda toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmada, EE ve NP'ye maruz bırakılan dişi bireylerin ovaryumlarında stromal dokuda, erkek bireylerin testisinde ise intersititiyel dokuda bağ doku kalınlaşmalarının

(fibrozis) varlığı belirlendi. Bu gözlem, gonadlarda apoptotik ölümden başka nekrotik ölümün de meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Bu çalışmada kontrol grubuna ait bireylerin testis ve ovaryum dokularında da apoptoz tespit edilmiştir. Apoptoz, balıklarda ovaryum gelişimi (Wood ve Van Der Kraak, 2001), gonad farklılaşması (Uchida ve ark., 2002), ve spermatogeneziste (Prisco ve ark., 2003; Corriero ve ark., 2007) rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Bu nedenle bu beklenebilecek bir gözlemdir.

EE, östrojen reseptörüne yüksek afiniteye sahip ve medyan efektif konsantrasyonu 17β östradiole kıyasla, yaklaşık olarak 11-27 kat daha fazla olan sentetik bir östrojendir (Thorpe ve ark., 2003). Balıklarda EE ile yapılan *in vivo* çalışmalarda erkek bireylerde EE'nin dişiye spesifik vitellogenin protein üretimini uyardığı (Verslycke ve ark., 2002; Versonnen ve Janssen, 2004) ve testis dokusunda oosit oluşumuna neden olduğu (Zillioux ve ark., 2002; Kidd ve ark., 2007; Zha ve ark., 2007) bildirilmiştir. Diğer balık türlerinde EE'nin oluşturduğu östrojenik etkilere paralel olarak, inci kefalinde de EE'ye 100 ng/l konsantrasyonda maruz bırakılan erkek bireylerden birinde ovotestis oluşumu gözlenmiştir.

Ovotestis oluşumu, NP'ye 60 $\mu\text{g/l}$ konsantrasyonda maruz bırakılan gruptaki bir erkek bireyde de gözlendi. NP'nin, hepatosit kültüründe vitellogenin sentezini uyardığı ve östrojen reseptörüne, 17β -östradiol'e kıyasla, 10^{-4} ile 10^{-6} arasında daha zayıf aktivite ile bağlandığı (Jobling ve Sumpter, 1993) ve olgun erkek bireylerde *in vivo*'da vitellogenin üretiminin yükselttiği ve ovotestis oluşumuna neden olduğu (Zha ve ark., 2007) bildirilmiştir. Bu çalışmada da NP'ye maruz bırakılan inci kefalinde bir bireyde ovotestis formasyonunun belirlenmesi NP'nin inci kefalinde de östrojenik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Gray ve Metcalfe (1997), yumurta açılımından üç ay sonrasına kadar NP'ye 50 ve 100 $\mu\text{g/l}$ konsantrasyonda maruz bırakılan *Oryzias latipes*'te erkek bireylerin, sırasıyla %50 ve %86 oranında ovotestise sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, bu çalışmada NP'ye maruz bırakılan gruplarda ovotestise sahip birey sayısında doza bağlı bir artış gözlenmedi. Ovotestis oluşumunun sadece 60 $\mu\text{g/l}$ 'lik NP konsantrasyonunda bir bireyde gözlenmesi, östrojenik kimyasallara bireysel bir duyarlılıktan kaynaklanabilir. Bu bulgular EE ve NP'nin inci

kefalinde erkek bireylerin testisinde histopatolojik değişim ve hücrel toksisitenin yanı sıra, östrojenik etkilere de yol açtığı şeklinde yorumlanabilir.

EE'nin Avrupa'daki yüzey sularında ve atık sulardaki konsantrasyonunun 0.5 ng/l'den 62 ng/l'ye kadar değişebildiği (Aherne ve Briggs, 1989, Desbrow ve ark., 1998; Larsson ve ark., 1999; Belfroid ve ark., 1999; Ternes ve ark., 1999; Kuch ve Ballschmiter, 2000) bildirilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri'nde ise EE'nin atıksu arıtma suyundaki konsantrasyonunun 1000 ng/l civarında olduğu belirlenmiştir (Tabak, 1981). NP'nin ise İngiltere'de atık sudaki konsantrasyonunun 330 µg/l olduğu ve bu atık suyun deşarj olduğu nehirde, NP konsantrasyonunun 180 µg/l'ye kadar ölçüldüğü (Blackburn ve Waldock, 1995), Amerika Birleşik Devletleri'nde ise NP'nin atık suda 6300 µg/l'ye kadar tespit edildiği (Hale ve ark., 2000) bildirilmiştir. Bu çalışmada NP ve EE için seçilen konsantrasyonlar da, her iki kimyasalın akuatik çevredeki konsantrasyonlarına uygun olarak belirlenmiştir.

Endokrin bozucuların Van gölü ve göle karışması muhtemel olan atık sulardaki tespiti ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Bununla birlikte, Van gölünde yaşayan dişi ve erkek balık popülasyonunda gonad anomalileri belirleyen Ünal ve ark., (2007), bu durumun çevresel kirleticilerden veya bilinmeyen diğer faktörlerden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamız sonucunda elde edilen bulgular da, inci kefalinin endokrin bozucu kimyasallara duyarlı bir tür olduğunu göstermekte ve gölde yaşayan bu endemik balık türünün, endokrin bozucu kimyasalların olumsuz etkilerinden korunması için tedbire yönelik çalışmaların yapılması gerektiğini işaret etmektedir.

5.2. CYP1A

Literatürde balıklarda EE ve NP gibi endokrin bozucu kimyasallara maruz bırakılma sonucunda, karaciğerde CYP1A enziminin immunohistokimyasal lokalizasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Bu çalışma, bir ilk olma özelliğine sahiptir.

Kontrol gruplarına ait kesitlerde CYP1A immunreaktivitesi sadece nukleus membranına ve plazma membranına bitişik alanda gözlendi bununla birlikte sitoplazmik alanda boyanma görülmedi benzer boyanma hepatik patolojiye sahip olmayan *Pseudopleuronectes americanus*'ta da gözlenmiştir (Smolovitz ve ark., 1989), bununla birlikte Lester ve ark., (1993), gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde yaptıkları elektron mikroskop incelemesinde, CYP1A enziminin perinükleolar alanda granüllü endoplazmik retikulumda belirlendiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda NP uygulanan gruplarda kontrol gruplarında olduğu gibi hepatosit sitoplazmasında CYP1A immunreaksiyonu gözlenmedi ve kontrol gruplarına kıyasla belirgin bir fark olmadığı belirlendi. NP'nin sıçanda EROD aktivitesini düşürdüğü ve CYP1A ifadesini azalttığı (Lee ve ark., 1996), *Salmo salar*'da CYP1A ifadesini baskıladığı (Arukwe ve ark., 1997), *Gadus morhua*'da, CYP1A seviyesinde azalmaya ve EROD aktivitesinde düşüşe neden olduğu (Sturwe ve ark., 2006) bildirilmiştir. Bu çalışmada kontrol gruplarında olduğu gibi NP'ye maruz bırakılan gruplarda da, hepatositlerde CYP1A enzimine ait sitoplazmik immunreaktivite gözlenmemesi, NP'nin inci kefalinde de CYP1A enzimini baskılayıcı etkisi hakkında bilgi vermese de, en azından CYP1A protein ifadesini uyarmadığı söylenebilir.

17 β -östradiolün alabalık karaciğer hücre kültüründe bazal EROD aktivitesini inhibe ettiği, (Navas ve Segner, 2000), CYP1A mRNA seviyesini düşürdüğü, (Navas ve Segner, 2001) ve CYP1A ifadesini baskıladığı (Elskus, 2004) belirlenmiştir. EE enjekte edilen *Cyprinus carpio*'da EROD aktivitesinin ve CYP1A protein ifadesinin belirlenmediği (Solé ve ark., 2000) ve EE'ye 7 gün süre ile maruz bırakılan *Salmo salar*'da CYP1A ifadesinin zamana ve doza bağımlı olarak azaldığı bildirilmiştir (Mortensen ve Arukwe, 2007). Bu sonuçlardan farklı olarak bu çalışmada EE'ye maruz bırakılan balıklarda hepatositlerin sitoplazmasında CYP1A immunboyanmasının doz artışı ile birlikte arttığı, ancak bu boyanmanın güçlü olmadığı gözlemlendi. Benzer olarak, Hasselberg ve ark., (2004), alkilfenol karışımına (C4-C7) ve 17 β östradiole maruz bırakılan *Gadus morhua*'nın erkek bireylerinde hepatik CYP1A protein ifadesinin doza bağımlı olarak arttığını gözlemlemişler, ancak dişi bireylerde, bu kimyasalların CYP1A protein ifadesinde etkili olmadığını bildirmişlerdir. EE'nin, BaP'a maruz bırakılan *Clarias gariepinus*'ta solungaçlarda EROD aktivitesini, BaP ile antagonistik olarak

inhibe ettiği ve tek başına solungaç EROD aktivitesini iki kat arttırdığı belirlenmiş bununla birlikte aynı etki karaciğerde gözlenmemiştir (Mdegela ve ark., 2006). Son ve ark., (2002) ise 17 β -östradiol'ün fare ovaryum kanser hücre hattında TCDD uyarımlı CYP1A protein ve mRNA ifadesini artırdığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, CYP1A enziminin uyarımının, uyarıcının dozuna, uyarım yoluna, türlere, yaşa ve cinsiyete (Snowberger ve ark., 1991; Smolowitz ve ark., 1992; Sleiederink ve ark., 1994; Arukwe ve Goksöyr, 1997; Van Veld ve ark., 1997; Anulacion ve ark., 1998) bağlı olarak farklılık gösterebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da EE'nin hepatosit sitoplazmasında doz artışı ile birlikte CYP1A immun boyanmasına neden olmasının altında bu faktörler de göz önünde tutulabilir.

EE'nin 100 ng/l konsantrasyonuna üç hafta süre ile maruz bırakılan *Oncorhynchus mykiss*'te hepatik gen ifadesinde değişimlerin meydana geldiği bildirilmiştir (Hook ve ark., 2007). Hepatik gen ifadesindeki değişimlerin EE'ye maruz bırakılan ovaryumektomize edilen sığanda da zamana ve doza bağımlı olarak arttığı ve karaciğerin östrojene yüksek seviyede yanıt verici bir doku olduğu rapor edilmiştir (Boverhof ve ark., 2004). Bu çalışmada EE'ye maruz bırakılan balıklarda hepatosit sitoplazmasında CYP1A immunboyanmasının gözlenmesinin, deney süresinin oldukça uzun olmasına ve gen seviyesindeki değişimlere bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, P450 izozimlerinin 17 β -östradiol (Lee ve ark., 2003) ve EE'nin (Wang ve ark., 2004) oksitativ metabolizasyonunu katalizleyebildikleri bildirilmiştir. Literatürde EE'nin CYP1A mRNA ve protein ifadesi üzerindeki etkisi ile ilgili uzun süreli bir çalışmaya rastlanmadı bu yüzden bulgumuz oldukça önemlidir. EE'nin CYP1A immunreaktivitesi üzerine olan bu etkisinin altında yatan nedenlerin aydınlatılması için daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

5.3. Plazma steroid seviyeleri

EE ve NP erkek ve dişi bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyelerinde değişime yol açmamakla birlikte 100 ng/l EE'ye maruz bırakılan erkek ve dişi bireylerde ve NP'nin 200 μ g/l konsantrasyonuna maruz bırakılan dişi bireylerde plazma T seviyesinin

bütün bireylerde minimum belirlenme limitinin (20 ng/dl) altında olduğu gözlemlendi. NP'nin hiçbir konsantrasyonunda erkek bireylerin plazma 17 β -östradiol seviyelerinde önemli bir değişim gözlemlenmedi. NP uygulanan erkek bireylerde plazma total T seviyesinin belirlenememe durumu göz önüne alındığında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı belirlendi.

EE'ye maruz bırakılan erkek bireylerde 17 β -östradiol seviyesinin değişmemesine karşılık, T seviyesi belirlenebilen birey sayısının doz artışına paralel olarak ölçüm aralığından (20-1000 ng/dl), minimum belirlenme limitinin altındaki değerlere (<20 ng/dl) düştüğü belirlendi. Bununla birlikte EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda, plazmasında T belirlenen birey sayısının, kontrol bireyelerine kıyasla, istatistiksel olarak azalma eğiliminde olduğu ($P= 0.06$, ki kare) gözlemlendi. Benzer olarak, atık su arıtma suyu ile kirlenen Misisipi nehrinde ve zirai atık suyu ile kirlenen Minnesota nehrinde yaşayan erkek *Cyprinus carpio*'da da T seviyesinin düştüğü (Folmar ve ark., 1996) ve atık su arıtma suyunun deşarj edildiği Misisipi nehrinde yaşayan *Stizostedion vitreum*'un erkek bireyelerinde serum T seviyesinin önemli bir şekilde düştüğü, 17 β -östradiol seviyesinde ise herhangi bir değişimin meydana gelmediği (Folmar ve ark., 2001) bildirilmiştir.

MacLatchy ve ark., (2003), 250 ng/l ve 1000 ng/l EE'ye *in vitro*'da maruz bırakılan *Fundulus heteroclitus*'a ait testis dokusu parçalarında androjen steroidogenezisinde değişimin meydana geldiğini ve testiste testosteron üretiminin düştüğünü bununla birlikte aynı dozlarda EE'ye maruz bırakılan erkek bireyelerde plazma T seviyelerinde düşüşün gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Labadie ve Budzinski, (2006), EE'ye maruz bırakılan juvenil *Psetta maxima*'nın erkek bireyelerinde testis ve plazmada androstenedion ve 11-ketotestosteronun belirlenemediğini, T seviyesinin ise hem testiste hem de plazmada azaldığını bildirmişlerdir. Literatüre uygun olarak, bu çalışmada da EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda erkek bireyelerin tamamında plazma T seviyesinin belirlenememesi EE'nin inci kefalinde de erkek bireyelerde plazma T seviyesini düşürücü bir etkiye sahip olduğunu gösterir.

17 β -östradiol (Govoroun ve ark., 2001) ve EE'ye (Baron ve ark., 2005) maruz bırakılan *Onchorhyncus mykiss*'te, steroidogenezde rol oynayan 17-hidroksilaz/liyaz (P450c17), 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β HSD) ve 11 β -hidroksilaz (P45011 β)

enzimlerinin testisteki mRNA ifadelerinde azalmanın meydana geldiği ve EE'ye maruz bırakılan juvenil *Psetta maxima*'nın erkek bireylerinde androjen üretimindeki değişimden dolayı, testis ve plazmada androstenedionun belirlenemediği (Labadie ve Budzinski, 2006) bildirilmiştir. Benzer olarak bu çalışmada da EE'ye maruz bırakılan erkek balıklarda plazma T seviyesinin belirlenememesi, T'nin öncüsü olan androstenedionun sentezinde rol oynayan steroidogenik enzimlerin (3 β HSD, P450c17, P45011 β) seviyelerindeki düşüşten kaynaklanabilir.

Plazma T seviyesi EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda, dişi bireylerde de belirlenemedi. Bununla birlikte aynı konsantrasyonda erkek ve dişi bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyesinin değişmediği gözlemlendi. T'nin 17 β -östradiol'e dönüşümünde rol oynayan ve normal olarak ovaryumda ifade edilen aromataz enziminin, EE'ye maruz bırakılan juvenil *Oryzias latipes*'in XY erkek bireylerinde belirlendiği (Scholz ve Gutzeit, 2001) ve EE'nin *Oryzias latipes*'in olgun erkek bireylerinde testis aromataz (CYP19) aktivitesini yükselttiği (Kashiwada ve ark., 2007) bildirilmiştir. Bu çalışmada EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda erkek ve dişi bireylerde plazma T seviyesinin belirlenememesi, aromataz aktivitesinin artmasına ve buna bağlı olarak T'nin kısa sürede 17 β -östradiol'e dönüşmesinden de kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda NP'nin hiçbir konsantrasyonunda erkek bireylerde plazma 17 β -östradiol seviyesinde ve plazmasında T belirlenebilen birey sayısında kontrol gruplarına kıyasla önemli bir değişim gözlemlenmedi. Benzer olarak, Villeneuve ve ark., (2002), NP'ye maruz bırakılan erkek *Cyprinus carpio*'da 17 β -östradiol ve T seviyelerinde önemli bir değişimin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. NP'nin hiçbir konsantrasyonunda dişi bireylerde 17 β -östradiol seviyesinin değişmediği, bununla birlikte NP'nin 200 μ g/l konsantrasyonunda dişi bireylerin tamamında plazma T seviyesinin belirlenemediği gözlemlendi. Bu grupta plazmasında T seviyesi belirlenebilen birey sayısında, kontrol bireylerine kıyasla önemli bir azalmanın olduğu belirlendi ($P < 0.05$, ki kare). NP'nin, *Scophthalmus maximus*'ta plazma 17 β -östradiol ve T seviyelerini erkek ve dişilerde önemli oranda düşürdüğü, *Gadus morhua*'da ise T ve 17 β -östradiol seviyelerinde önemli bir değişime yol açmadığı, (Martin-Skilton ve ark.,

2006), juvenil *Psetta maxima*'nın erkek bireylerinde ise plazma T seviyesinin yedi kat azalttığı, dişilerde ise değiştirmedeği ve her iki cinsiyette plazma 17 β -östradiol seviyelerini etkilemediği (Labadie ve Budzinski, 2006) belirlenmiştir. Nonilfenol etoksilatın maruz bırakılan *Pimephales promelas*'ta plazma 17 β -östradiol ve T konsantrasyonlarının erkek ve dişi bireylerde önemli bir değişim göstermediği gözlenmiştir (Nichols ve ark., 2001). Bu çalışmalardan da anlaşılacağı gibi NP'nin plazma 17 β -östradiol ve T seviyeleri üzerine etkisi, türe ve cinsiyete göre değişebilmektedir. Bu çalışmada NP'nin erkek bireylerde T ölçülebilen birey sayısında ve 17 β -östradiol seviyelerinde önemli bir değişime neden olmadığı gözlendi. NP, dişi bireylerde 17 β -östradiol seviyesinde değişime yol açmazken, konsantrasyon artışına paralel olarak T belirlenen birey sayısında önemli bir azalmaya neden olduğu bulundu. Buna göre dişi bireylerin, NP'ye, erkek bireylerden daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Çalışmada, kontrol bireyleri de dahil olmak üzere bazı bireylerde plazma T seviyesinin belirlenme limitinin (20 ng/dl) altında olduğu gözlendi. Bununla birlikte kontrol gruplarında (kontrol+solvent kontrol) plazma T seviyesi, erkek bireylerin %75'inde belirlenirken, dişi bireylerin %29,4'ünde belirlendi. Erkek bireylerde ölçüm yüzdesinin dişi bireylerden yüksek olması, erkek bireylerde T'nin plazmadaki konsantrasyonunun daha yüksek seviyelerde olduğunu gösterir. Buna göre bazı bireylerde plazma T seviyesinin belirlenememesi, bu durumun ölçüm hassasiyetinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Plazmasında T seviyesi belirlenebilen birey sayısının EE ve NP'nin konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı bununla birlikte T'nin EE'nin 100 ng/l konsantrasyonunda bütün bireylerde ve NP'nin 200 μ g/l konsantrasyonunda dişi bireylerin tamamında, minimum belirlenme limitinin altında olması istatistiksel değerlendirmeyi güçleştirse de östrojenik kimyasalların inci kefalinde T seviyesini azaltıcı etkiye sahip olduğu konusunda fikir vermektedir ancak net bir sonuç için GC/MS ve HPLC/MS gibi daha hassas ölçüm yöntemlerine dayalı çalışmaya gereksinim vardır.

5.4. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, EE ve NP'nin üç farklı konsantrasyonuna (0.1, 1 ve 10 μM) 24 saat boyunca *in vitro*'da maruz bırakılan inci kefali karaciğer hücrelerinde apoptotik hücre ölümünde artış olduğu gözlemlendi ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Serumsuz medyumda NP'ye 0, 0.01, 0.1, 1 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda maruz bırakılan PC12 hücrelerinde meydana gelen apoptozda artış olduğu ancak bu artışın 1 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda anlamlı olduğu belirtilmiştir (Aoki ve ark., 2004). Başka bir çalışmada ise NP'nin 0.1, 1 ve 10 μM konsantrasyonlarına 2, 4 ve 6 saat boyunca maruz bırakılan timositlerde, apoptozun 4. ve 6. saatlerde anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (Yao ve ark., 2006). Literatürde EE ve NP'nin karaciğer hücre kültüründe apoptoz üzerine olan etkisi ile ilgili olarak balıklarda ve memelilerde yapılmış çalışmalara rastlanamadı. Yukarıda belirtilen çalışmalara göre, NP'ye maruz kalan hücrelerde meydana gelen apoptozun, hücre tipine, doza ve zamana bağımlı olarak farklılık gösterebildiği görülmektedir. Bu çalışmada EE ve NP'nin 0.1, 1 ve 10 μM 'lık konsantrasyonlarının 24 saatlik süre içerisinde apoptozu uyarmadığı ve anlamlı bir toksik etki oluşturmadıkları söylenebilir.

5.5. Sonuç

Sonuç olarak, EE ve NP'nin inci kefalinin karaciğer ve gonadlarında apoptozu uyardığı ve gonadlarda histopatolojik değişimlere yol açarak bu organlar için toksik etkiye sahip olduğu, EE'nin erkek ve dişi bireylerde, NP'nin ise dişi bireylerde testosteron seviyelerini etkileyebileceği gözlemlendi. EE'ye uzun süreli (32 gün) maruz kalımdan sonra CYP1A protein ifadesinin şiddetli olmasa da uyarılabildiği, NP'nin ise bu protein ifadesine etkisinin olmadığı, immunohistokimyasal olarak, belirlendi. Bu sonuçlar, EE ve NP'nin nominal konsantrasyonlarının dahi inci kefali için toksik etki ile endokrin bozulma oluşturma gücüne sahip olduklarını gösterir ve inci kefalinin EE ve NP'ye duyarlı bir tür olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment-I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. *Water Research*, (28): 1131-1142.
- Aherne, G.W., Briggs, R., 1989. The Relevance of the Presence of Certain Synthetic Steroids in the Aquatic Environment. *J. Pharm. Pharmacol.*, (41): 735-736.
- Anonim, 2008. İstatistiksel Tablolar, Tatlısu Ürünleri, Avlanan Tatlısu Ürünleri Miktarı. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=47&ust_id=13 Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara. Erişim tarihi: 18.07.2008.
- Anulacion, B.F., Myers M.S., Willis, M.L., Collier, T.K., 1998. Quantitation of CYP1A Expression in Two Flatfish Species Showing Different Prevalences of Contaminant-Induced Hepatic Disease. *Marine Environmental Research*, (46): 7-11.
- Aoki, M., Kurasaki, M., Saito, T., Seki, S., Hosokawa, T., Takahashi, Y., Fujita, H., Iwakuma, T., 2004. Nonylphenol Enhances Apoptosis Induced by Serum Deprivation in PC12 Cells. *Life Sciences*, (74): 2301-2312.
- Arukwe, A., Förlin, L., Goksøyr, A., 1997. Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (16): 2576-2583.
- Arukwe, A., Goksøyr, A., 1997. Changes in Three Hepatic Cytochrome P450 Subfamilies During a Reproductive Cycle in Turbot (*Scophthalmus maximus L.*). *Endocrinology*, (277): 313-325.
- Arukwe, A., Knudsen, F.R., Goksøyr, A., 1997. Fish Zona Radiata (Eggshell) Protein: A Sensitive Biomarker for Environmental Estrogens. *Environmental Health Perspectives*, (105): 418-422.
- Arslan, O.C., Parlak, H., Oral, R., Katalay, S., (2007). The Effects of Nonylphenol and Octylphenol on Embryonic Development of Sea Urchin, (*Paracentrotus lividus*). *Arcives of Environmental Contamination and Toxicology*, (53): 214-219.

- Arslan, O.C., Parlak, H., (2007). Embriyotoxic Effects of Nonylphenol and Octylphenol in Embriyonic Development of Sea Urchin *Arbacia lixula*. *Ecotoxicology*, (16): 439-444.
- Baron, D., Fostier, A., Breton, B., Guiguen, Y., 2005. Androgen and Estrogen Treatments Alter Steady State Messengers RNA (mRNA) Levels of Testicular Steroidogenic Enzymes in the Rainbow Trout. *Molecular Reproduction and Development*, (71): 471-479.
- Bartke, A., 1995., Editorial: Apoptosis of Male Germ Cells, A Generalized or a Cell Type-Specific Phenomenon? *Endocrinology*, (136): 2-4.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schäfer, A.J., Rijs, G.B., Wegener, J., Cofino, W.P., 1999. Analysis and Occurrence of Estrogenic Hormones and Their Glucuronides in Surface water and Waste Water in The Netherlands. *Science of the Total Environment*, (225): 101-108.
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in Fish: Proposal for a Protocol to Assess Aquatic Pollution. *Journal of Fish Diseases*, (22): 25-34.
- Bevan, C.L., Porter, D.M., Prasad, A., Howard, M.J., Henderson, L.P., 2003. Environmental Estrogens Alter Early Development in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*, (111): 488-496.
- Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of Alkylphenols in Rivers and Estuaries in England and Wales. *Water Res.*, (29): 1623–1629.
- Boverhof, D.R., Fertuck, K.C., Burgoon, L.D., Eckel, J.E., Gennings, C., Zacharewski, T.R., 2004. Temporal- and Dose-Dependent Hepatic Gene Expression Changes in Immature Ovariectomized Mice Following Exposure to Ethinyl Estradiol. *Carcinogenesis*, (25): 1277-1291.
- Brevini, A.L.T., Zanetto, S.B., Cillo, F., 2005. Effects of Endocrine Disruptors on Developmental and Reproductive Functions. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Disorders*, (5): 1-10.
- Bursch, W., Fuerhacker, M., Gemeiner, M., Grillitsch, B., Jungbauer, A., Kreuzinger, N., Moesti, E., Scharf, S., Schmid, E., Skutan, S., Walter, I., 2004. Endocrine Disruptors in the Aquatic Environment: The Austrian Approach-ARCEM. *Water Science Technology*, (50): 293-300.

- Chaves-Pozo, E., Mulero, V., Meseguer, J., Ayala, A.G., 2005. An Overview of Cell Renewal in the Testis Throughout the Reproductive Cycle of a Seasonal Breeding Teleost, the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). ***Biology of Reproduction***, (72): 593-601.
- Christiansen, T., Korsgaard, B., Jespersen, Å., 1998. Effects of Nonylphenol and 17 β -Oestradiol on Vitellogenin Synthesis, Testicular Structure and Cytology in Male Eelpout *Zoarces viviparus*. ***The Journal of Experimental Biology***, (201): 179-192.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. ***Environmental Health Perspectives***, (101): 378-384.
- Columbano, A., Shinozuka, H., 1996. Liver Regeneration Versus Direct Hyperplasia. ***The FASEB Journal***, (10): 1118-1128.
- Corriero, A., Desantis, S., Bridges, C.R., Kime, D.E., Megalofonou, P., Santamaria, N., Cirillo, F., Ventriglia, G., Di Summa, A., Deflorio, M., Campobasso, F., De Metrio, G., 2007. Germ Cell Proliferation and Apoptosis during Different Phases of Swordfish (*Xiphias gladius* L.) Spermatogenetic Cycle. ***Journal of Fish Biology***, (70): 83-99.
- Çetinkaya, O., Öksüz, A., 1996. Van Gölü İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Populasyonunun Yapısı, Büyüme, Üreme, Beslenme Özellikleri ve Avcılığı. ***Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fak. Dergisi***, (6): 1-15.
- Danulat, E., Selcuk, B., 1992. Life History and Environmental Conditions of the Anadromous *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) in the Highly Alkaline Lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. ***Arch. Hydrobiol.***, (126): 105-125.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and *in vitro* Biological Screening. ***Environ. Sci. Technol.***, (31): 1549-1558.
- Diniz, M.S., Peres, I., Pihan, J.C., 2005. Comparative Study of the Estrogenic Responses of Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Treated Municipal

- Sweage Effluent (Lisbon) During Two Periods in Different Seasons. *Science of the Total Environment*, (349): 129-139.
- Drevnick, P.E., Sandheinrich, M.B., Oris, J.T., 2006. Increased Ovarian Follicular Apoptosis in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) Exposed to Dietary Methylmercury. *Aquatic Toxicology*, (79): 49–54.
- Drummond, C.D., Bazzoli, N., Rizzo, E., Sato, Y., 2000. Postovulatory Follicle: A Model for Experimental Studies of Programmed Cell Death or Apoptosis in Teleosts. *J. of Exp. Zool.*, (287): 176-182.
- Elp, M., Çetinkaya, O., 2000. İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811)'nin Üreme Biyolojisi Üzerine Bir Araştırma. *IV. Su Ürünleri Sempozyumu*. 28-30 Haziran 2000, Erzurum. 51-66.
- Elskus, A.A., Estradiol and Estriol Suppress CYP1A Expression in Rainbow Trout Hepatocytes. *Marine Environmental Research*, (58): 463-467.
- Fent, K., 2001. Fish Cell Lines as Versatile Tools in Ecotoxicology: Assessment of Cytotoxicity, Cytochrome P4501A Induction Potential and Estrogenic Activity of Chemicals and Environmental Samples. *Toxicology in Vitro*, (15): 477-488.
- Fentress, J.A., Steele, S.L., Bart, Jr., H.L., Cheek, A.O., 2006. Reproductive Disruption in Wild Longear Sunfish (*Lepomis megalotis*) Exposed to Kraft Mill Effluent. *Environmental Health Perspectives*, **114**: 40-45.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette, L.J., Jr, 1996. Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus carpio*) captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Environmental Health Perspectives*, (104): 1096-1101.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C., Jr. Guillette, L.J., 2001. Altered Serum Sex Steroids and Vitellogenin Induction in Walleye (*Stizostedion vireum*) Collected Near a Metropolitan Sewage Treatment Plant. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (40): 392-398.
- Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L., Ancora, S., Mori, G., Neri, G., Romeo, T., Ausili, A., 2004. Evaluation of Ecotoxicological Effects of Endocrine Disruptors During a Four-Year Survey of the Mediterranean Population of Swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Environmental Research*, (58): 425-429.

- Foster, W.G., Neal, M.S., YoungLai, E.V., 2004. Endocrine Disrupters and Ovarian Function. *International Congress Series*, (1266): 126-132.
- Gavrieli, Y., Sherman Y., Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labelling of Nuclear DNA Fragmentation. *The J. of Cell Biol.*, (119): 493-501.
- Giesy, J.P., Pierens, S.L., Snyder, E.M., Miles-Richardson, S., Kramer, V.J., Snyder, S.A., Nichols, K.M., Villeneuve, D.A., 2000. Effects of 4-Nonylphenol on Fecundity and Biomarkers of Estrogenicity in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, (19): 1368-1377.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The Cytochrome P-450 System in Fish, Aquatic Toxicology and Environmental Monitoring. *Aquatic Toxicology*, (22): 287-312.
- Gong, Y., Han, X.D., 2006. Effect of Nonylphenol on Steroidogenesis of Rat Leydig Cells. *Journal of Experimental Science and Health*, (41): 705-715.
- Govoroun, M., McMeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., Guiguen, Y., 2001. 17 β -Estradiol Treatment Decreases Steroidogenic Enzyme Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Rainbow Trout Testis. *Endocrinology*, (142): 1841-1848.
- Gray, M.A., Metcalfe, C.D., 1997. Induction of Testis-Ova in Japanese Medeka (*Oryzias latipes*) Exposed to p-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (16): 1082-1086.
- Gray Jr., L.E., 1998. Xenoendocrine Disrupters: Laboratory Studies on Male Reproductive Effects. *Toxicology Letters*, (102-103): 331-335.
- Hale, R.C., Smith, C.L., De Fur, P.O., Harvey, E., Bush, E.O., La Guardian, M.J., Vadas, G.G., 2000. Nonylphenols in Sediments and Effluents Associated with Diverse Wastewater Outfalls. *Environ. Toxicol. Chem.*, (19): 946-952.
- 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 Systems of Male Rats. *Reproductive Toxicology*, (19): 215-221.
- Harrison, P.T.C., Holmes, P., Humfrey, C.D.N., 1997. Reproductive health in Humans and Wildlife: Are Adverse Trends with Environmental Chemical Exposure? *The Science of the Total Environment*, (205): 97-106.

- Hassanin, M., Kuwahara, S., Nurdihayat, Tsukamoto, Y., Ogawa, K., Hiramatsu, K., Sasaki, F., 2002. Gonadosomatic Index and Testis Morphology of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Rivers Contaminated with Estrogenic Chemicals. *J. Vet. Med. Sci.*, (64): 921-926.
- Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., Hegelund, T., Celander, M.C., 2004. Effects of Alkylphenols on CYP1A and CYP3A Expression in First Spawning Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, (67): 303-313.
- Haubruege, E., Petit, F., Cage, M.J.G., 2000. Reduced Sperms Counts in Guppies (*Poecilia reticulata*) Following Exposure to Low Levels of Tributyltin and Bisphenol A. *Proc. R. Soc. Lond.*, **267**: 2333-2337.
- Hernández-Rodríguez, G., Zumbado, 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 Sparague Dawley Rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (23): 73-81.
- Higashitani, T., Tamamoto, H., Takahashi, A., Tanaka, H., 2003. Study of Estrogenic Effects on Carp (*Cyprinus carpio*) Exposed to Sewage Treatment Plant Effluents. *Water Sci. Technol.*, (47): 93-100.
- Hook., S.E., Skillman, A.D., Small, J.A., Schultz, I.R., 2007. Temporal Changes in Gene Expression in Rainbow Trout Exposed to Ethynyl Estradiol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (145): 73–85.
- Hughes, F.M., Gorospe, W.C., 1991. Biochemical Identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanisms Underlying Follicular Atresia. *Endocrinology*, (129): 2415-2422.
- Husøy, A.-M., Myers, M.S., Willis, M.L., Collier, T.K., Celander, M., Goksøyr, A., 1994. Immunohistochemical Localization of CYP1A and CYP3A-Like Isozymes in Hepatic and Extrahepatic Tissues of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.), a Marine Fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (129): 294-308.
- Hussein, M.R., 2005. Apoptosis in the Ovary: Molacular Mechanisms. *Human Reproduction Update*, (11): 162-178.
- Janz, D. M., McMaster, M.E., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G., 1997. Elevated Ovarian Follicular Apoptosis and Heat Shock Protein-70 Expression in White

- Sucker Exposed to Bleached Kraft Pulp Mill Effluent. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (147): 391-398.
- Jobling, S., Sumpter, J.P., 1993. Detergent Components in Sewage Effluent are Weakly Oestrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, (27): 361-372.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (15): 194-202.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ. Sci. Technol.*, (32): 2498-2506.
- Kannan, K., Keith, T.L., Naylor, C.G., Staples, C.A., Snyder, S.A., Giesy, J.P., 2003. Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Fish, Sediment, and Water from the Kalamazoo River, Michigan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (44): 77-82.
- Kaptaner, B., Ünal, G., 2006. Apoptosis in Postovulatory Follicles of *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. *E.U. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, (23): 263-267.
- Kashiwada, S., Kameshiro, M., Tatsuta, H., Sugaya, Y., Kullman, S.W., Hinton, D.E., Goka, K., 2007. Estrogenic Modulation of CYP3A38, CYP3A40 and CYP19 in Mature Male Medeka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, (145): 370-378.
- Kavanagh, R.J., Balch, G.C., Kiparissis, Y., Nimi, A.J., Sherry, J., Tinson, C., Metcalfe, C.D., 2004. Endocrine Disruption and Altered Gonadal Development in White Perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. *Environmental Health Perspectives*, (112): 898-902.
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazochak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a Fish Population after Exposure to a Synthetic Estrogen. *PNAS*, (104): 8897-8901
- Kim, S.K., Kim, B.K., Shim, J.H., Gil, J.E., Yoon, Y.D., Kim, J.H., 2006. Nonylphenol and Octylphenol-Induced Apoptosis in Human Embryonic Stem Cells Is Related to Fas-Fas Ligand Pathway. *Toxicological Sciences*, (94): 310-321.

- Kinberg, K., Toft, G., 2003. Effects of Estrogenic and Androgenic Compounds on the Testis Structure of the Adult Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **54**: 16-24.
- Knoebl, I., Hemmer, J.H., Denslow, N.D., 2004., Induction of Zona Radiata and Vitellogenin Genes in Estradiol and Nonylphenol Exposed Male Sheepshead Minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Environmental Research*, (58): 547-551.
- Kuch, H.M., Ballschiter, K., 2000. Determination of Endogenous and Exogenous Estrogens in Effluents from Sewage Treatment Plants at the ng/L-level. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, (366): 392-395.
- Kylarová, D., Procházková, J., Madarová, J., Bartoš J., Lichnovsky V., 2002. Comparison of the TUNEL, Lamin B and Annexin V Methods for the Detection of Apoptosis by Flow Cytometry. *Acta Histochem.*, (104): 367-370.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2006. Alteration of Steroid Hormone Balance in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) Exposed to Nonylphenol, Bisphenol A, Tetrabromodiphenyl Ether 47, Diallylphthalate, Oil, and Oil Spiked with Alkylphenols. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (50): 552-561.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2006. Alteration of Steroid Hormone Profile in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) as a Consequence of Short-Term Exposure to 17 α -Ethinylestradiol. *Chemosphere*, (64): 1274-1286.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersen, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., 1999. Ethinylestradiol-an Undesired Fish Contraceptive?. *Aquatic Toxicology*. (45): 91-97.
- Lee, P.C., Patra, S.C., Stelloh, C.T., Lee, W., Struve, M., 1996. Interaction of Nonylphenol and Hepatic CYP1A in Rats. *Biochemical Pharmacology*, (52): 885-889.
- Lester, S.M., Braunbeck, T.A., Teh, S.J., Stegeman, J.J., Miller, M.R., Hinton, D.E., 1993. Hepatic Cellular Distribution of Cytochrome P-450 IA1 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): An Immunohisto- and Cytochemical Study. *Cancer Research*, (53): 3700-3706.

- Liney, K.E., Jobling, S., Shears, J.A., Simpson, P., Tyler, C.R., 2005. Assessing the Sensitivity of Different Life Stages for Sexual Disruption in Roach (*Rutilus rutilus*) Exposed to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environmental Health Perspectives*, (113): 1299-1307.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine Disruptors in the Environment (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, (75): 631-681.
- Maclatchy, D.L., Courtenay, S.C., Rice, C.D., Van Der Kraak, G.J., 2003. Development of A Short-Term Reproductive Endocrine Bioassay Using Steroid Hormone and Vitellogenin End Points in the Estuarine Mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, (22): 996-1008.
- Martin-Skilton, R., Thibaut, R., Porte, C., 2006. Endocrine Alteration in Juvenil Cod andTurbot Exposed to Dispersed Crude Oil and Alkylphenols. *Aquatic Toxicology*, (78): 57-64.
- Mdegela, R.H., Braathen, M., Correia, D., Mosha, R.D., Skaare, J.U., Sandvik, M., 2006. Influence of 17 α -Ethinylestradiol on CYP1A, GST and Biliary FACs Responses in Male African Shaptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) Exposed to Waterborne Benzo[a]Pyrene. *Ecotoxicology*, (15): 629-637.
- Miller, M.R., Hinton, D.E., Blair, J.J., Stegeman, J.J., 1988. Immunohistochemical Localization of Cytochrome P-450E in Liver, Gill and Heart of Scup (*Stenotomus chrysops*) and Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Marine Environmental Research*, (24): 37-39.
- Moffit, J. S., Bryant, B. H., Hall, S. J., Boekelheide, K., 2007. Dose-Dependent Effects of Sertoli Cell Toxicants 2,5-Hexanedione, Carbendazim, and Mono-(2-ethylhexyl) phthalate in Adult Rat Testis. *Toxicologic Pathology*, (35): 719-727.
- Mortensen, A.S., Tolfsen, 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.

- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2007. Effects of 17 α - Ethinylestradiol on Hormonal Responses and Xenobiotic Biotransformation System of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, (85): 113-123.
- Navas, J.M., Segner, H., 2000. Modulation of 7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) Activity by Estradiol and Octylphenol. *Marine Environmental Research*, (50): 157-162.
- Navas, J.M., Segner, H., 2001. Estrogen-Mediated Suppression of Cytochrome P4501A (CYP1A) Expression in Rainbow Trout Hepatocytes: Role of Estrogen Receptor. *Chemico-Biological Interactions*, (138): 285-298.
- Nichols, K.M., Snyder, E.M., Snyder, S.A., Pierens, S.L., Miles-Richardson, S.R., Giesy, J.P., 2001. Effects of Nonylphenol Ethoxylate Exposure on Reproductive Output and Bioindicators of Environmental Estrogen Exposure in Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, (20): 510-522.
- Norbury, C. J., Zhivotovsky, B., 2004. DNA Damage-Induced Apoptosis. *Oncogene*, (23): 2797–2808.
- Ochi, T., Induction of Multiple Microtubule-Organizing Centers, Multipolar Spindles and Multipolar Division in Cultured V79 Cells Exposed to Diethylstilbestrol, Estradiol-17 β and Bisphenol A. *Mutation Research*, (431): 105-121.
- Palace, V.P., Wautier, K.G., Evans, R.E., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Chalanchuk, S.M., Godard, D., McMaster, M.E., Tetreault, G.R., Peters, L.E., Vandenbyllaardt, L., Kidd, K.A., 2006. Biochemical and Histopathological Effects in Pearl Dace (*Margariscus margarita*) Chronically Exposed to a Synthetic Estrogen in a Whole Lake Experiment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (25): 1114-1125.
- Palumbo, A., Yeh, J., 1994. In Situ Localization of Apoptosis in the Rat Ovary during Follicular Atresia. *Biol. of Reprod.*, (51): 888-895.
- Penaz, M., Svobodova, Z., Barus, M., Prokes, M., Drastichova, J., 2005. Endocrine Disruption in a Barbel, *Barbus barbus*, Population from the River Jihlava, Czech Republic. *J. Appl. Ichtyol.*, (21): 420-428.

- Piechotta, G., Lacorn, M., Lang, T., Kammann, U., Simat, T., Jenke, H.-S., Steinhart, H., 1999. Apoptosis in Dab (*Limanda limanda*) as Possible New Biomarker for Anthropogenic Stress. *Ecotox. and Environ. Safety*, (42): 50-56.
- Prisco, M., Liguoro, A., Comitato, R., Cardone, A., D'onghia, B., Ricchiari, L., Angelini, F., Andreuccetti, P., 2003. Apoptosis during Spermatogenesis in the Spotted Ray *Torpedo marmorata*. *Molecular Reproduction and Development*, (64): 341-348.
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., Vassalli, P., 1997. An Early and Massive Wave of Germinal Cell Apoptosis is Required for the Development of Functional Spermatogenesis. *The EMBO Journal*, (16): 2262-2270.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In vivo Responses in Trout and Roach. *Env. Sci. Technol.*, (32): 1559-1565.
- Sarasquete, C., Segner, H., Cytochrome P4501A (CYP1A) in Teleostean Fishes 2000. A Review of Immunohistochemical Studies. *The Science of the Total Environment*, (247): 313-332.
- Savabieasfahani, M., Lochmiller, R.L., David, M.J., 1999. Elevated Ovarian and Thymic Cell Apoptosis in Wild Cotton Rats Inhabiting Petrochemical-Contaminated Terrestrial Ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, (57): 521-527.
- Scholz, S., Gutzeit, H.O., 2000. 17 α -ethinylestradiol Affects Reproduction, Sexual Differentiation and Aromatase Gene Expression of the Medeka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, (50): 363-373.
- Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H., Knoerr, S., Braunbeck, Th., Kalbfus, W., Negele, R.D., 2002. How Estrogenic is Nonylphenol? A Transgenerational Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a Test Organism. *Aquatic Toxicology*, (59): 177-189.
- Schwartzman, R.A., Cidlowski, J.A., 1993. Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. *Endocrinology*, (14): 133-151.
- Sleiderink, H. M., Oostingh, I., Goksøyr, A., Boon, J. P., 1995. Sensitivity of Cytochrome P450 1A Induction in Dab (*Limanda limanda*) of Different Age and

- Sex as a Biomarker for Environmental Contaminants in the Southern North Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (28): 423-430.
- Smolowitz, R.M., Moore, M.J., Stegeman J.J., 1989. Cellular Distribution of Cytochrome P-450E in Winter Flounder Liver with Degenerative and Neoplastic Disease. *Marine Environmental Research*, (28): 441-446.
- Smolowitz, R.M., Schultz, M.E., Stegeman, J.J., 1992. Cytochrome P4501A Induction in Tissues, Including Olfactory Epithelium, of Topminnows (*Poeciliopsis* spp.) by Waterborne benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, (13): 2395-2402.
- Snowberger, E.A., Woodin, B.R., Stegeman, J.J. (1991). Sex Differences in Hepatic Monooxygenases in Winter Flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and Scup (*Stenotomus chrysops*) and Regulation of P450 Forms by Estradiol. *Journal of Experimental Zoology*, (259): 330-342.
- Solé, M., Porte, C., Barceló, D., 2000. Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17 α -Ethinylestradiol. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, (38): 494-500.
- Son, D.-S., Roby, K.F., Rozman, K.K., Terranova, P.F., (2002). Estradiol Enhances and Estriol Inhibits the Expression of CYP1A1 Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a Mouse Ovarian Cancer Cell Line. *Toxicology*, (176): 229-243.
- Stegeman, J.J., Smolowitz, R.M., Hahn, M.E., 1991. Immunohistochemical Localization of Environmentally Induced Cytochrome P450IA1 in Multiple Organs of the Marine Teleost *Stenotomus chrysops* (Scup). *Toxicology and Applied Pharmacology*, (110): 486-504.
- Sturve, J., Hasselberg, L., Fälth, H., Celander, M., Förlin, L., 2006. Effects of North Sea Oil and Alkylphenols on Biomarker Responses in Juvenile Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *Aquatic Toxicology*, (78): 73-78.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*, (103): 173-178.

- Sweet, L.I., Passino-Reader, D.R., Meier, P.G., Omann, G.M., 1999. Xenobiotic-Induced Apoptosis: Significance and Potential Application as a General Biomarker of Response. *Biomarkers*, (4): 237-253.
- Tabak, H.H., 1981. Steroid hormones as water pollutants. II. Studies on the persistence and stability of natural urinary and synthetic ovulation-inhibiting hormones in untreated and treated wastewaters. *Dev. Ind. Microbiol.*, (22): 497-519.
- Tanaka, J.N., Grizzle, J.M., 2002. Effects of Nonylphenol on the Gonadal Differentiation of the Hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, (57): 117-125.
- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total. Environ.*, **225**: 81-90.
- Terrones, J., Vidal, S., Cal, R., Martinez, P., Piferrer, F., 2003. Apoptosis during Gametogenesis in Diploid and Triploid Turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, (28): 369-370.
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2003. Relative Potencies and Combination Effects of Steroidal Estrogens in Fish. *Environ. Sci. Technol.*, (37): 1142-1149.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Johnson, A.L., Hsueh, A.J.W., 1991. Involvement of Apoptosis in Ovarian Follicular Atresia and Postovulatory Regression. *Endocrinology*, (129): 2799-2801.
- Tilly, J.L., 1996. Apoptosis and Ovarian Function. *Reviews of Reproduction*, (1): 162-172.
- Tilly, J.L., 1998. Molecular and Genetic Basis of Normal and Toxicant-Induced Apoptosis in Female Germ Cells. *Toxicology Letters*, (102-103): 497-501.
- Tilton, F., Benson, W.H., Schlenk, D., 2001. Elevation of Serum 17- β -estradiol in Channel Catfish Following Injection of 17- β -estradiol, Ethinyl Estradiol, Estrone, Estriol and Estradiol-17- β -glucuronide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (9): 169-172.
- Tollefsen, K.-E., Mathisen, R., Stenersen, J., 2003. Induction of Vitellogenin Synthesis in An Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hepatocyte Culture: A Sensitive *in vitro*

- Bioassay for the Oestrogenic and Anti-oestrogenic Activity of Chemicals. *Biomarkers*, (8): 394-407.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2002. Oocyte Apoptosis during the Transition from Ovary-like Tissue to Testes during Sex Differentiation of Juvenile Zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, (205): 711-718.
- Uguz, C., Iscan, M., Ergüven., A., Isgor, B., Togan, I., 2003. The Bioaccumulation of Nonylphenol and its Advers Effect on the Liver of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Environmental Research*, (92): 262-270.
- Ünal, G., Çetinkaya, O., Elp, M., 1999. Histological Investigation of Gonad Development of *Chalcalburnus tarichi* (P., 1811). *Tr. J. of Zool.*, (23): 329-338.
- Ünal, G., Türkoğlu, V., Oğuz, A.R., Kaptaner, B., 2007. Gonadal Histology and Some Biochemical Characteristics of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) Having Abnormal Gonads. *Fish Physiology and Biochemistry*, (33): 153-165.
- Van Den Belt, K., Wester, P.W., Van Der Ven, L.T.M., Verheyen, R., Witters, H., 2002. Effects of Ethinylestradiol on the Reproductive Physiology in Zebrafish (*Danio rerio*): Time Dependency and Reversibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (21): 767-775.
- Van Veld, P.A., Vogelbein, W.K., Cochran, M.K., Goksøyr, A., Stegeman, J.J., 1997. Route-Specific Cellular Expression of Cytochrome P4501A (CYP1A) in Fish (*Fundulus heteroclitus*) Following Exposure to Aqueous and Dietary Benzo[a]pyrene. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (142): 348-359.
- Verslycke, T., Vandenberg, G.F., Versonnen, B., Arijs, K., Janssen, C.R., 2002. Induction of Vitellogenesis in 17 α -ethinylestradiol-Exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): A Method Comparison. *Comparative Biochemistry and Physiology*, (132): 483-492.
- Versonnen, B.J., Janssen, C.R., 2004. Xenoestrogenic Effects of Ethinylestradiol in Zebrafish (*Danio rerio*). *Inc. Environ. Toxicol.*, (19): 198-206.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An Integrated Assessment

- of Estrogenic Contamination and Biological Effects in the Aquatic Environment of The Netherlands. *Chemosphere*, (59): 511-524.
- Vickers A.E.M., Lucier, G.W., 1991. Estrogen Receptor, Epidermal Growth Factor Receptor and Cellular Ploidy in Elutriated Subpopulations of Hepatocytes during Liver tumor Promotion by 17 α -ethinylestradiol in Rats. *Carcinogenesis*, (12): 391-399.
- Vigano, L., Arillo, A., Bottero, S., Massari, A., Mandich, A., 2001. First Observation of Intersex Cyprinids in the Po River (Italy). *The Science of the Total Environment*, (269): 189-194.
- Villeneuve, D.L., Villalobos, S.A., Keith, T.L., Snyder, E.M., Fitzgerald, S.D., Giesy, J.P., 2002. Effects of Waterborne Exposure to 4-Nonylphenol on Plasma Sex Steroid and Vitellogenin Concentrations in Sexually Mature Male Carp (*Cyprinus Carpio*). *Chemosphere*, (47): 15-28.
- Wang, B., Sanchez, R.I., Franklin, R.B., Evans, D.C., Huskey, S.-E.W., 2004. The Involvement of CYP3A4 and CYP2C9 in the Metabolism of 17 α -Ethinylestradiol. *Drug Metabolism and Disposition*, (32): 1209-1212.
- Wang, J.Y.J., 2001. DNA Damage and Apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, (8): 1047-1048.
- Weber, L.P., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., Janz, D.M., 2004. Increased Kidney, Liver, and Testicular Cell Death after Chronic Exposure to 17 α -Ethinylestradiol in Medeka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, (23): 792-797.
- Weber, L.P., Janz, D.M., 2001. Effect of Beta-naphthoflavone and Dimethylbenz[a]anthracene on Apoptosis and HSP70 Expression in Juvenile Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Ovary. *Aquat. Toxicol.*, (54): 39-50.
- Weber, L.P., Kiparissis, Y., Hwang, G.S., Nimi, A.J., Janz., D.M., Metcalfe., C.D., 2002. Increased Cellular Apoptosis after Chronic Aqueous Exposure to Nonylphenol and Quercetin in Adult Medeka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, (131): 51-59.

- Weber, L.P., Hill, Jr, R.L., Janz, D.M., 2003. Developmental Estrogenic Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological Evaluation of Gametogenesis and Organ Toxicity. *Aquatic Toxicology*, (63): 431-446.
- Wester, P.W., van der Ven, L.T.M., Vos, J.G., 2004. Comparative Toxicological Pathology in Mammals and Fish: Some Examples with Endocrine Disrupters. *Toxicology*, (205): 27-32.
- Wood, A.W., Van Der Kraak, G., 2001. Apoptosis and Ovarian Function: Novel Perspectives from the Teleosts. *Biol. of Reprod.*, (64): 264-271.
- Wyllie, A.H., 1980. Glucorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis is Associated with Endogenous Endonuclease Activation. *Nature*, (284): 555-556.
- Xiao, Q., Zhang, S., Zhao, B., 2007. Toxic Effects of Nonylphenol on the Gonad of Adult Rosy Barb. *Huan Jing Ke Xue*, (28): 2580-2585.
- Yao, G., Yang, L., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y., 2006. Nonylphenol-Induced Thymocyte Apoptosis Involved Caspase-3 Activation and Mitochondrial Depolarization. *Molecular Immunology*, 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.
- Young, K.A., Zikrin, B.R., Nelson, R.J., 1999. Short Photoperiods Evoke Testicular Apoptosis in White Footed Mice (*Peromyscus leucopus*). *Endocrinology*, (140): 3133-3139.
- Zha, J., Wang, Z., Wang, N., Ingersoll, C., 2007. Histological Alteration and Vitellogenin Induction in Adult Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*) after Exposure to Ethinylestradiol and Nonylphenol. *Chemosphere*, (66): 488-495.
- Zillioux, E.J., Johnson, I.C., Kiparissis, Y., Metcalfe, C.D., Wheat, J.V., Ward, S.G., Liu, H., 2001. The Sheepshead Minnow as an in vivo Model for Endocrine Disruption in Marine Teleost: A Partial Life-Cycle Test with 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, (20): 1968-1978.

ÖZ GEÇMİŞ

Burak KAPTANER, 1979 yılında Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 1996 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. Bu bölümden 2000 yılında "Biyolog" ünvanı ile mezun oldu. 2001 Eğitim Öğretim Yılı Güz Döneminde, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisansını Doç. Dr. Güler ÜNAL danışmanlığında, "İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Ovulasyondan Sonra Ovaryum Folikül Hücrelerinde Apoptozun Gösterilmesi" isimli çalışma ile tamamladı. 2004-2005 Eğitim Öğretim Yılı Güz Döneminde Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Bilim Dalı'nda doktora eğitimine başladıktan sonra 2004 yılı Aralık ayında Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılı Şubat ayında Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK gözetiminde çalışmak üzere Y.Y.Ü. Tıp Fakültesi Sinirbilim (Neuroscience) Araştırma Birimi'ne, bir yıl süre ile görevlendirildi. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.