

**Dİ-N-BÜTİL FİTALAT'IN SAZAN BALIKLARINDA
(*Cyprinus carpio*) HSP70, GPX, SOD, CYP1A VE
VITELLOGENİN ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

**MOLECULAR STUDIES ON TOXIC EFFECTS OF DI-N-
BUTYL PHTHALATE ON HSP70, GPX, SOD, CYP1A AND
VITELLOGENIN IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*)**

HIZLAN HINCAL AĞUŞ

PROF. DR. SİBEL SÜMER
Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

HIZLAN HINCAL AĞUŞ'UN hazırladığı “**Di-n-bütil Fitalat'ın Sazan Balıklarında (Cyprinus carpio) Hsp70, GPx, SOD, CYP1A ve Vitellogenin Üzerine Toksik Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol AKSÖZ

Başkan

.....

Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

Danışman

.....

Prof. Dr. Figen ÜNLÜ ERKOÇ

Üye

.....

Prof. Dr. Nuran DİRİL

Üye

.....

Prof. Dr. Hatice MERGEN

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Akademik hazırlanma sürecimde desteğini benden esirgemeyen ve geleceğe olan inancuma destek olan; henüz küçük bir çocukken insanın köklerini bilimsel olarak açıklayıp beni aydınlatan, biyolojiyi sevdiğini ve her türlü dogma ve karanlığa "hayatını" ortaya koyarak meydan okuyan Biyoloji öğretmeni "babam" a ve yoldaşı "annem" e ithaf edilmiştir..

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

23/01/2014

HIZLAN HINCAL AĞUŞ

ÖZET

Dİ-N-BÜTİL FİTALAT'IN SAZAN BALIKLARINDA (*Cyprinus carpio*) HSP70, GPX, SOD, CYP1A VE VITELLOGENİN ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Hızlan Hıncal AĞUŞ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

Ocak 2014, 131 sayfa

Çevre kirliliği doğayı gittikçe daha fazla tehdit etmektedir. Sanayiide plastikleştirici ajan olarak kullanılan fitalatlar özellikle sucul ortamları kirletmektedirler. Bu çalışmada, kozmetikte, boya üretiminde, parfümde katkı maddesi olarak, oyuncakların yapımında ve günlük hayatta kullandığımız birçok araç-gereçte polimerleşme ajanı olarak kullanılan ve maruz kalınan “di-n-bütıl filatat” (DBP) maddesinin sucul ortamdaki canlılarda oluşturduğu toksik etkiler moleküler düzeyde incelenmiştir. Deney hayvanı olarak OECD'nin belirlediği model sucul test organizması sazan balığı (*Cyprinus carpio*) kullanılmıştır. Deney düzeneği, di-n-bütıl fitalatla (1 mg/l) dozlanan sazan balıklarından oluşan deney grubu (D) ve kontrol grubu (K) olarak planlanmıştır. Deney grubu balıklar asetonda çözünen DBP'ye maruz bırakılmışlardır. Dozlamadan sonra 4. saatte, 24. saatte ve 96. saatte örnek olarak alınan sazan balıklarının solungaç ve karaciğerlerinde Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD ve GPx proteinlerinin gerçek-zamanlı ters transkriptaz-PCR ile gen ekspresyonu düzeyinde ve western blotlama ile protein seviyesi düzeyinde yarı-kantitatif analizleri yapılmıştır.

Analizler sonucunda, ısı şoku stresinde ve kimyasallara maruziyette organizmanın yanıt olarak sentezlediği Hsp70'in, solungaç dokusunda mRNA seviyelerinin 4.

saatte ve 24. saatte sırasıyla 5,17 ve 5,4 kat azaldığı, 96. saatte ise 3,86 kat arttığı; karaciğer dokusunda ise mRNA seviyelerinin 4. saatte 1,16 kat, 24. saatte 2,35 kat ve 96. saatte 1,85 kat arttığı bulunmuştur. Hsp70 protein seviyeleri de mRNA seviyeleriyle korelasyon göstermiştir. CYP1A mRNA seviyeleri solungaç dokusunda 4. saatte 7 kat, 24. saatte 1,22 kat ve 96. saatte 2,15 kat artmış, karaciğerde ise bunun tersine, sırasıyla 1,76 kat, 8,46 kat ve 1,08 kat azalmıştır. Protein seviyeleri mRNA seviyeleri ile yarı yarıya değişim göstermiş, ancak korelasyon bulunmuştur. Karaciğerde sentezlenen Vtg'nin mRNA seviyeleri 24. saatte 2,27 kat azalırken, 96. saatte 1,49 kat artmıştır. Protein seviyelerinde ise değişim gözlenmemiştir. SOD mRNA seviyelerinde solungaçlarda anlamlı değişim gözlenmemiştir. Karaciğerde ise mRNA seviyeleri 4. ve 24. saatlerde sırasıyla 2,58 ve 2,67 kat, 96. saatte 10,82 kat artmıştır. Solungaçlarda GPx mRNA seviyeleri değişmezken, karaciğerde saate göre sırasıyla 1,18, 2,45 ve 1,6 kat artmıştır.

DBP, karaciğer dokusunda SOD ve GPx seviyelerinin katlı artışına sebep olmuştur. Oksidatif strese bağlı olarak Hsp70 seviyelerinin organ spesifik değişimler gösterebileceği bilinmektedir. Solungaçlar su ortamında DBP ile doğrudan ve geniş bir yüzeyle maruz kaldığından, ksenobiyotiklerin karsinojenik metabolitlere dönüşümünü sağlayan CYP1A seviyeleri katlı artış göstermiş olabilir. Temel metabolizma organı karaciğer ise daha korunaklı olup, ksenobiyotiklerin vücut tarafından daha seyreltilmiş miktarlarına maruz kaldığından CYP1A'da artış gözlenmemiş, hatta azalma gözlenmiştir. Bu azalış ve buna zıt olarak, karaciğer Hsp70 seviyelerindeki artış, hücresel koruma mekanizmalarının stresi yenmeye çalıştığına ve CYP1A metabolizmasıyla üretilen, hücreye zararlı radikallerin oluşmasının engellendiğine işârettir. Solungaçta oksidatif strese dair bulgu olmasa da, DBP ve sazan balığı ile yapılan çalışmalarda gözlenen nekroz ve diğer bozukluklar göz önünde tutularak, solungaç Hsp70 seviyelerinin ilk 24 saatteki azalması, hücrelerin savunma mekanizmasında yetersiz kalmış olabileceği ve enerjinin korunmaya çalışıldığı düşünülebilir.

Ayrıca, bu çalışma ile çevre kirleticisi fitalatların sucul canlılar üzerine etkilerinin anlaşılması ve kirlilik biyobelirteci olarak yöntem geliştirilmesi için literatüre katkı sağlanmıştır. Gerçek-zamanlı ters transkriptaz-PCR, moleküler ekotoksikolojik

Çalışmalarda kullanılabilir hassas, doğruluğu yüksek, tekrarlanabilir ve hızlı bir yöntem olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DBP, Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD, GPx, Gerçek-zamanlı RT-CPR, Western Blotlama, Moleküler Toksikoloji, Kirlilik Biyobelirteci.

ABSTRACT

MOLECULAR STUDIES ON TOXIC EFFECTS OF DI-N-BUTYL PHTHALATE ON HSP70, GPX, SOD, CYP1A AND VITELLOGENIN IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio*)

Hızlan Hıncal AĞUŞ

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. E. Sibel SÜMER

January 2014, 131 pages

Environmental pollution increasingly threatens nature. Phthalates used as plasticizers contaminate aquatic habitats principally. In this study, toxic effects of “di-n-butyl phthalate” (DBP), which is used in the manufacture of children toys, as excipients in perfumes, in manufacture of paints and cosmetics and as polymerization agent within a great deal of instruments used in daily life, were studied in the living organisms of the aquatic habitat at the molecular level. Common carp (*Cyprinus carpio*), a model aquatic organism by OECD, was used as experimental animal. Experimental setup was planned as an experimental group (E), which was comprised of fish dosed with di-n-butyl phthalate (1 mg/l), and control group (C). Fish in the experimental group were exposed to DBP in acetone. Samples representing 4, 24 and 96 hours after dosing were taken. Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD and GPx proteins in gills and livers of fish were analysed semi-quantitatively in the level of gen expression by real-time reverse transcriptase-PCR and in the level of protein by western blotting.

As the result of analyses, it was shown that mRNA levels of Hsp70 in gills, which is synthesized by the organism in response to heat shock and chemical exposure, decreased 5.17 fold and 5.4 fold in 4 and 24 hours respectively, but increased 3.86 fold in 96 hour; but mRNA levels of Hsp70 in liver increased 1.16 fold in 4 hour,

2.35 fold 24 hour and 1.85 fold in 96 hour. Protein levels of Hsp70 correlated with mRNA levels. CYP1A mRNA levels in gills increased 7 fold in 4 hour, 1.22 fold in 24 hour and 2.15 fold in 96 hour, however decreased 1.76 fold, 8.46 fold and 1.08 fold respectively in liver. Protein levels were observed half and half according to mRNA levels, but correlated with each other. mRNA levels of Vtg, a protein synthesized in the liver, decreased 2.27 fold in 24 hour, whereas mRNA levels decreased 1.49 fold in 96 hour. No alterations were observed in protein levels. Significant alterations were not observed in SOD mRNA levels. Besides, SOD mRNA levels in gills increased 2.58 fold, 2.67 fold and 10.82 fold in 4, 24 and 96 hours respectively. GPx mRNA levels in the liver increased 1.18 fold, 2.45 fold and 1.6 fold in a time dependent manner, whereas no change was recorded in gills in any time group.

DBP caused fold increase of SOD and GPx levels in liver. It is known that Hsp70 levels may represent organ specific alterations dependent on oxidative stress. It is possible that levels of CYP1A which provides transformation of xenobiotics to carcinogenic metabolites may represent fold increase in gills, where gills are exposed with their wide exposure surface directly to DBP. Any increment in liver CYP1A levels was not observed, as a matter of fact a reduction was observed, in which liver, essential organ of the metabolism, is well protected and exposed to more diluted amounts of xenobiotics by organism according to gills. With this reduction, an increase in Hsp70 levels indicate that cellular defense mechanisms responsible for defending against stress and preventing formation of reactive radicals formed by CYP1A metabolism. Although there is no evidence for oxidative stress in gills, by keeping in mind that necrosis and other disorders observed in other studies with DBP and common carp, it is conceivable that cells failed in the mechanism of cellular protection and in charge of energy conservation by taking into consideration a decrease of Hsp70 levels in gills during the first 24 hour.

Furthermore, contribution to literature was provided with this study in understanding the effects of phthalates as environmental pollutants on aquatic organisms and for method development for contamination biomarker. Real-time reverse transcriptase-PCR was determined as a sensitive, accurate, reproducible and rapid method for use in molecular ecotoxicological studies.

Keywords: DBP, Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD, GPx, Real-time RT-PCR, Western Blotting, Molecular Toxicology, Contamination Biomarker.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. E. Sibel Sümer'e, projenin hazırlanması ve model organizmanın bulunmasında emeği geçen Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Figen Ünlü Erkoç'a, Aksaray Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Belda Erkmen'e, Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji ABD öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Ayhan Özkul'a ve Arş. Gör. Gözde Yücel'e, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Tıbbî Biyokimya ABD Merkez Laboratuvarı'nda görevli öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Aylin Sepici Dinçel'e, laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi yüksek lisans öğrencisi Pınar Arslan'a, laboratuvar olanaklarından faydalanmamı sağlayan Dr. İ. Çağatay Karaaslan'a, ayrıca tüm lisansüstü eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen doktora öğrencisi arkadaşlarım Egemen Foto, Fatma Zilifdar, Zeliha Soysal, Gülcan Kuyucuklu, Vedat Mutlu ve tüm Anabilim Dalı akademik ve teknik personeline, bugüne kadar beni her konuda destekleyip, bana güvenerek her zaman yanımda olan çok değerli ve sevgili aileme en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

BU TEZ ÇALIŞMASI, PROF. DR. E. SİBEL SÜMER'İN YÜRÜTÜCÜLÜĞÜNDEKİ
212T185 NO.LU TÜBİTAK TBAG PROJESİ TARAFINDAN DESTEKLENMİŞTİR.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER	xii
TABLolar.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Fitalatlar ve Di-n-Bütıl Fitalat (DBP).....	1
1.2 Fitalatların Canlı Organizmalarda Metabolizması ve Toksisitesi	3
1.3 Fitalatların Protein Sentezi, Gen Ekspresyonu ve Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri.....	8
1.4 Fitalatların Sucul Organizmalar Üzerine Toksik Etkileri ve Tetkik Yöntemleri.	15
1.5 Organizmada Oluşan Stres Yanıtı.....	20
1.5.1 Isı Şok Yanıtı	21
1.5.1.1 Isı Şok Proteinleri İle Yapılan Ekspresyon Çalışmaları.....	29
1.5.2 Çevresel Stres, Oksidatif Stres ve Ksenobiyotik Metabolizması.....	31
1.5.2.1 Sitokrom P450: Oksidatif Stres ve Kirlilik Biyobelirteci Olarak CYP1A	35
1.5.2.2 Evrensel Radikal Temizleyiciler: SOD, GPx ve Katalaz.....	45
1.6 Vitellogenin: Biyosentezi, Endokrin Bozucu Kimyasallarla İlişkisi ve Biyobelirteç Olarak Kullanılması	48
1.7 Bu Çalışmanın Amacı.....	52
2. MATERYAL VE METOT.....	55
2.1 Balık Materyalinin Temin Edilmesi ve Deney Planı	55
2.2 Su Parametrelerinin Ölçülmesi	55
2.3 Enzimler ve Kimyasallar	55
2.4 Metotlar	56
2.4.1 Total RNA İzolasyonu.....	56
2.4.2 Total RNA Saflığının ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	57
2.4.3 Total RNA Bütünlüğünün Analizi	57
2.4.4 Protein Homojenatlarının Hazırlanması ve Total Protein Tayini	58

2.4.5 İki Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-time) PCR	59
2.4.5.1 Ters Transkripsiyon İle cDNA (Komplementer DNA) Sentezi.....	60
2.4.5.2 Real-time PCR Koşulları ve Primer Dizileri.....	61
2.4.5.3 Referans Genin Seçilmesi	63
2.4.6 SDS-PAGE ve Western Blotlama.....	64
2.4.6.1 SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi)	64
2.4.6.2 Elektrobloklama.....	66
2.4.6.3 İmmunodeteksiyon (Kolorimetrik Yöntem).....	67
2.4.7 İstatistik Hesaplamalar	68
3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	69
3.1 Protein Miktar Tayini Sonuçları ve Standart Kalibrasyon Eğrisi.....	69
3.2 Real-Time PCR Analizleri.....	69
3.2.1 Real-Time PCR Standart Kalibrasyon Grafiği.....	70
3.2.2 Real-Time PCR Amplikonlarının Erime Eğrisi Analizi.....	72
3.2.3 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Hsp70 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri	73
3.2.4 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak CYP1A Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri	75
3.2.5 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak SOD Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri	77
3.2.6 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak GPx Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri.....	79
3.2.7 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Vtg Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri.....	81
3.2.8 Real-Time PCR Yöntemi İçin Referans Genin Seçilmesi	83
3.3 Protein Seviyelerinin Western Blot Analiziyle Belirlenmesi.....	84
3.3.1 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Hsp70 Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	84
3.3.2 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak CYP1A Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi.....	87
3.3.3 DBP'nin 4., 24. ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Vtg Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi	90
3.4 Tartışma	94
KAYNAKLAR.....	105

EKLER	128
Ek 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi.....	128
ÖZGEÇMİŞ	130

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 1.1 Di-n-bütül Fitalatın Kimyasal Yapısı	2
Şekil 1.2 Fitalatların Genel Hidroliz Mekanizmaları	7
Şekil 1.3 Sıçan Testisinde Testosteron Biyosentez Mekanizması.....	11
Şekil 1.4 Balıkta Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Ekseninde Kimyasal Problemlere Özgü Etki Mekanizmaları	17
Şekil 1.5 Hsp70 Gen Ekspresyonunun Regülasyonu	25
Şekil 1.6 HSF1 Domain ve Lösün Fermuarlarının İnert Monomerik Formda Gösterilmesi	26
Şekil 1.7 HSP70 Ailesinin Filogenetik Sınıflandırması ve Gen Yapıları.....	28
Şekil 1.8 Metabolik Detoksifikasyon ve Reaktif Oksijen Türlerinin Üretilmesi.....	34
Şekil 1.9 Sitokrom P450'nin Katalizlediği Temel Hidroksilasyon Reaksiyonu.....	36
Şekil 1.10 Sitokrom P450 Ailelerinin Filogenetik Sınıflandırması	39
Şekil 1.11 AhR Sinyal Yolu ve CYP1A'nın İndüklenmesi İçin Önerilen İki Model .	44
Şekil 1.12 Faz II Metabolizmada SOD, GPx ve Katalazın Metabolizması	46
Şekil 1.13 Teleost Balıklarda Vitellogeninin Evrimsel Analizi	50
Şekil 2.1 Agaroz jelde yürütülen total RNA izolatlarının 18S ve 28S rRNA bantlarının görüntüsü	58
Şekil 3.1 BCA Metoduyla Belirlenen Standart Kalibrasyon Grafiği	69
Şekil 3.2 Real-time PCR Analizi Sonrası Amplikonların Agaroz Jeldeki Görüntüsü..	70
Şekil 3.3 Kontrol cDNA havuzundan 5 katlı seyreltilmiş standartların PCR reaksiyonu sonucu belirlenen Cq değerlerine karşı çizilen standart kalibrasyon grafiği.	71
Şekil 3.4 Standart dilüsyon amplikonlarının Cq değerlerini gösteren grafik	71
Şekil 3.5 Erime piklerinin negatif türevleri alınarak çizilen grafik. Sıcaklığa karşı SBYR Green I floresan ışımaya değerleri çizilmiştir.....	72
Şekil 3.6 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında solungaç Hsp70 gen ekspresyonu	74
Şekil 3.7 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında karaciğer Hsp70 gen ekspresyonu	74

Şekil 3.8 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında solungaç CYP1A gen ekspresyonu.....	76
Şekil 3.9 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer CYP1A gen ekspresyonu.....	76
Şekil 3.10 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında solungaç SOD gen ekspresyonu.....	78
Şekil 3.11 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer SOD gen ekspresyonu.....	78
Şekil 3.12 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında solungaç GPx gen ekspresyonu.....	80
Şekil 3.13 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer GPx gen ekspresyonu	80
Şekil 3.14 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında ve pozitif kontrol β -östradiol gruplarında karaciğer Vtg gen ekspresyonu.....	82
Şekil 3.15 Referans genlerden GAPDH, EF-1 α ve β -aktin için real-time PCR ile ölçülen Cq değerleri	83
Şekil 3.16 DBP'nin sazan balığı solungaç dokusunda Hsp70 protein seviyelerine etkisi	85
Şekil 3.17 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda Hsp70 protein seviyelerine etkisi	86
Şekil 3.18 DBP'nin sazan balığı solungaç dokusunda CYP1A protein seviyelerine etkisi	88
Şekil 3.19 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda CYP1A protein seviyelerine etkisi	89
Şekil 3.20 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda Vtg protein seviyelerine etkisi	91
Şekil 3.21 Sazan Balığında (<i>C. carpio</i>) Sublethal DBP Maruziyeti ile Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD ve GPx'in Zamana Bağımlı Ekspresyon Profilleri	93

TABLULAR

Sayfa

Tablo 1.1 Dört Fitalatın Fizikokimyasal Özellikleri	3
Tablo 1.2 Kedi Balığında (<i>P. fulvidraco</i>) DBP ve DEHP Maruziyeti Sonucu Vücut Ağırlıklarında ve Ölüm Oranlarında Tespit Edilen Değişimler.....	4
Tablo 1.3 İnsan ve Sıçan Derisinin Absorpsiyon Hızları	8
Tablo 1.4 DBP'nin Bazı Sucul Organizmalarda Tespit Edilen Toksikolojik Parametreleri.....	19
Tablo 1.5 Organizmanın Stres Yanıtında Hedef Genler ve Kimyasal İndükleyiciler	21
Tablo 1.6 Isı şoku Proteinlerinin Hücresel Lokasyonları ve Görevleri.....	23
Tablo 1.7 Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları ve Katabolizmaları	33
Tablo 1.8 Elektron Transferinde Görevli Protein Bileşenlerinin Topolojisine Göre P450 Sistemleri	38
Tablo 1.9 Sık Çalışılan P450 Alt Ailelerinin Özellikleri.....	40
Tablo 1.10 Çevre Koruma Ajansının Bildirdiği Endokrin Bozucu Kimyasallar	51
Tablo 2.1 PCR Koşulları, Primerler ve Özellikleri	62
Tablo 2.2 Western Blotlama Protokolünde Kullanılan Malzemeler.....	65
Tablo 3.1 DBP Maruziyeti ile Sazan Balığında (<i>C. carpio</i>) mRNA ve Protein Seviyelerinde Rölatif Değişimler.....	92

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Cu	Bakır
Fe	Demir
Mn	Mangan
p	İstatistiksel önem seviyesi
S	Kükürt

Kısaltmalar

(w/w)	(ağırlıkça yüzde)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
¹⁴ C	Karbon-14
3-MC	3-metil kolantren
A	Adenin
AP-1	Aktivatör protein-1
ATP	Adenozin trifosfat
Balb/3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre hattı
BBP	n-bütil benzil fitalat
bcl-2	B-hücreli lenfoma geni-2
bç	Baz çifti
C	Sitozin
CAS	Chemical Abstracts Service
cm	Santimetre
DEHP	Di(2-etilhekzil) fitalat
DIDP	Di-izodesil fitalat
DINP	Di-izononil fitalat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DnaK	Bakteriyel moleküler şaperonu
DNaz	Deoksiribonükleaz

DNEL	Türetilmiş etkisiz seviye
DNOP	Di-n-oktil fitalat
E2	Östradiol
EC	(Kimyasal maddenin) Avrupa Kimyasal Kimliği
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EF-1 α	Elongasyon Faktörü-1 α
ELISA	Enzim-Bağımlı İmmünosorbent Deneyi
ERO1	Endoplazmik retikulum oksidoreduktin 1
ER α	Östrojen reseptörü α
ER β	Östrojen reseptörü β
ER γ	Östrojen reseptörü γ
FAD	Flavin adenin dinükleotit
Fas	Apoptozda ölüm faktörü
FMN	Flavin mononükleotit
G	Guanin
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
Grp78	Glukoz-regüleli protein-78 kDa
GSH	Redükte glutatyon
GSK-3 β	Glikojen sentaz kinaz-3 β
GST	Glutatyon-S-transferaz
HCl	Hidrojen klorür
Hsp40/J	Bakteriyel ısı şoku proteini 40-J domainli; şaperon DnaJ
hsp70B	Isı şoku proteini 70B
IL-1 β	İnterlökin-1 β
IL-6	İnterlökin-6
ITT	İntratestiküler testosteron
JNK	c-Jun N-terminal Kinaz
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
kPa	Kilopaskal
LC ₅₀	Ortalama öldürücü doz
LH	Lüteinize edici hormon
LOAEL	Gözlenen en düşük ters etki değeri
MA-10	Fare Leydig tümör hücre hattı

MAPK	Mitojen-aktifli protein kinaz
MBeP	Mono-benzil-fitalat
MBP	Monobütill fitalat
MEP	Monoetil fitalat
MHC	Büyük doku uygunluk kompleksi
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MMP	Monometil fitalat
mRNA	Messenger RNA (elçi RNA)
mRNP	Mesajcı ribonükleoprotein partikülleri
mtHsp75	Mitokondriyal ısı şoku proteini 75 kDa
n	mol
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit-redükte
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat-redükte
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Bankası)
NF-kB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (=aktive edilmiş B hücrelerinin kappa-hafif zincir-arttırıcı nükleer faktörü)
ng	Nanogram
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
P450	Sitokrom P450
p53	Tümör proteini 53
PARP	Poli (ADP-riboz) polimeraz
PCB-77	3,3',4,4'-tetraklorobifenil
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
pERK1/2	Fosfo-ekstraselüler sinyalle regüle edilen kinaz
pl3K	Fosfatidilinositol-3-kinaz
PMSF	Fenilmetansülfonilflorid
Rad51	Rekombinaz 51
RecA	Rekombinaz A
RNA	Ribonükleik asit

RT-PCR	Ters transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Scarb1	Scavenger reseptör sınıf B üye 1
Ser	Serin
STAT3	Transkripsiyon 3'ün sinyal transdükleyicisi ve aktivatörü
T	Timin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thoc5	THO kompleksi 5
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
TNF- α	Tümör nekroz faktörü- α
TRPM-2	Transient Reseptör Potansiyel Melastatin 2
U	Ünite
UDP	Üridin difosfat
UDPGT	Üridin difosfat glukuronoziltransferaz
USEPA	Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı
UV	Ultraviyole
v	Volt
zHSF1a	zebra balığı ısı şoku faktörü 1a
zHSF1b	zebra balığı ısı şoku faktörü 1b

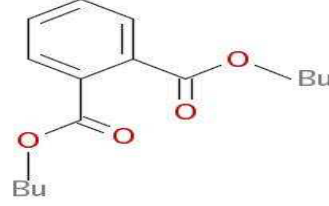
1. GİRİŞ

1.1 Fitalatlar ve Di-n-Bütil Fitalat (DBP)

Fitalatlar sanayide organik çözücü ve katkı maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılan kimyasal maddelerdir [1]. Başlıca polivinil kloridin üretim işleminde plastikleştirici olarak [2], kozmetik boyalarında, mürekkep üretiminde, vernik ve parfümde, tıbbî cihazlarda, yiyeceklerin paketlerinde, farmasötik kaplama malzemelerinde, oyuncaklarda ve bilgisayar gereçlerinde [3], biyositlerin içinde kovucu ve taşıyıcı sıvı olarak kullanılmaktadırlar [4]. Fitalatlar, yoğunlaştırılmış sülfirik asidin katalizör olarak kullanıldığı ve fitalik anhidrit ve n-bütanol'den Fisher esterifikasyonu kullanılarak sentezlenen fitalik asit (1,2-benzen dikarboksilik asit) esterleridirler [2]. Di-n-bütil fitalat vakum distilasyonu veya aktif kömür kullanılarak saflaştırılır [5]. Reaktif olmayan plastikleştiriciler olarak fitalat esterleri yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin esnekliğini ve sağlamlığını artırırlar [2], dolayısıyla polimere kimyasal olarak bağlanmazlar ve plastikten çevreye bulaşıp, akarsuların, içme sularının ve göllerin kirlenmesine sebebiyet vermektedirler [6]. Bunun yanında katı atık tesislerinden de yüksek düzeyde süzüntü atık rapor edilmiştir [7]. Fitalatlar ilk olarak 1926'da polivinil kloridin (PVC) katkı maddesi olarak kullanılmıştır ve günümüzde de oldukça yaygın ve önemli bir katkı maddesi olarak plastik içeren hemen hemen her araç ve gereçte bulunmaktadır [3]. Dibütil fitalatın dietil hekzil fitalat, diizoheptil fitalat, diizodesil fitalat, benzil bütil fitalat gibi izoformları da sanayide çokça kullanılmaktadır [8].

Di-n-bütil fitalat -69°C 'de erir, 340°C ve 1 kPa basınçta buharlaşır, suda çözünürlüğü ise 20°C 'de 10 mg/l'dir ve sıvı fazında fiziki hali yağlı sıvı biçimindedir [5]. Çizelge 1.1'de di-n-bütil fitalat ve sık kullanılan diğer fitalat esterlerinin fizikokimyasal özellikleri verilmiştir. Dibütil fitalatın molekül formülü: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$; Molekül ağırlığı: 278,34 g/mol; CAS numarası: 84-74-2; EC numarası: 201-557-4; Buhar basıncı: 25°C 'de $9.7 \pm 3.3 \times 10^{-5}$ kPa; Partizyon katsayısı n-oktanol/su (log değeri): 20°C 'de log Kow 4.57; Teknik dibütil fitalat konsantrasyonu: $\geq \%99$ (w/w) olarak belirtilmiştir [9]. Di-n-bütil fitalatın kimyasal yapısı Şekil 1.1'de verilmiştir. DBP 2001 yılında direktif 67/548/ECC Ek:1 içinde sınıflandırılmış ve indeks numarası 607-318-00-4 olarak belirlenmiştir. Reprodüktif kategori 2; R61 (doğmamış çocuğa zarar verebilir); reprodüktif kategori 3; R62 (döllenmeyi bozma

riski); N; R50 (Çevre için tehlikeli: Sucul organizmalar için çok toksik); Sembolleri T; N olarak verilmiştir [9].



Şekil 1.1 Di-n-bütül Fitalatın Kimyasal Yapısı [9].

Avrupa’da DBP ve DEHP 2001 yılında, BBP 2004 yılında, DIBP ise 2009 yılında reprotoksik olarak sınıflandırılmış; oyuncak ve çocuk bakım ürünlerinde ise 2005’de sınırlandırılmışlardır. Bu üç fitalat molekülünün kullanımı için son yetkilendirilme tarihi ise 2013 yılında dolmuştur ve oyuncak güvenlik direktifine göre (2009/48/EC) karsinojenik, mutajenik veya üreme sistemine toksik etkisi olan bu maddelerin 2013 yılından sonra kullanılması yasaklanmıştır [9]. Ülkemizde ise 20.10.2005 tarih ve 25972 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan “Oyuncak ve Çocuk Bakım Eşyalarındaki Fitalatlar Hakkında Tebliğ”e göre çocuk sağlığının korunması için oyuncaklar ve çocuk bakım eşyalarının bileşimlerinde yer alan ve çocukların sağlığı açısından zararlı olan veya zarar riski taşıyan bazı fitalatlara sınırlama getirilmiştir. Buna göre “DEHP, DBP, BBP, DINP, DIDP ve DNOP maddelerini içeren oyuncak ve çocuk bakım eşyalarında toplam ağırlığın %0,1’inden daha fazla fitalat esteri bulunmamalıdır” [10].

Kanada’nın Quebec, Ontario ve Alberta şehirlerinin iç su örneklerinde DEHP maddesi 0,29-300 µg/l, DBP maddesi 0,04-14 µg/l ve DOP maddesi 0,02-7 µ/l aralığında rapor edilmiştir [8]. Nijerya’da ise sanayi atıklarının boşaltıldığı Olojuoro akarsuyunda bu miktarlar DEHP için 4,74 µg/l ve DBP için 11,40 µg/l konsantrasyonlarda rapor edilmiştir [11]. Fitalat maddesi için sudaki miktarlar bakımından USEPA limitleri 3 µg/l olarak belirlenmiş olmasına rağmen, dünyada sanayinin olduğu ve atıkların boşaldığı hemen her akarsuda fitalat esterleri çok daha yüksek miktarlarda tespit edilmiştir [11]–[14]. Fitalatlar temiz su kaynaklarını kirleterek yiyecek ve içecek yoluyla hayvanlara ve insanlara bulaşabilir [9].

Tablo 1.1 Dört Fitalatın Fizikokimyasal Özellikleri [9]

Özellik	Madde	Değer
Fiziksel Hal	DEHP	Renksiz yağlı sıvı
	BBP	Sıvı
	DBP	Yağlı sıvı
	DIBP	Renksiz sıvı
Erime Noktası	DEHP	-55 veya -50°C
	BBP	<-35°C
	DBP	-69°C
	DIBP	-37°C
Kaynama Noktası	DEHP	385°C
	BBP	370°C
	DBP	340°C
	DIBP	320°C
Rölatif Yoğunluk	DEHP	0.98 g/cm ³ , 20°C'de
	BBP	1,116 g/cm ³ , 20°C'de
	DBP	1,045 g/cm ³ , 20°C'de
	DIBP	
Buhar Basıncı	DEHP	0,000034 Pa, 20°C'de
	BBP	0,00112 Pa, 20°C'de
	DBP	9,7±3,3 x 10 ⁻³ Pa, 20°C'de
	DIBP	0,01 Pa, 20°C'de
Suda Çözünürlük	DEHP	3 µg/l, 20°C'de
	BBP	2,8 mg/l, 25-30°C'de
	DBP	10 mg/l, 20°C'de
	DIBP	20 mg/l, 20°C'de
Partisyon Katsayısı n-oktanol/su (log değeri)	DEHP	7,5
	BBP	4,84
	DBP	4,57
	DIBP	4,11

1.2 Fitalatların Canlı Organizmalarda Metabolizması ve Toksikitesi

İnsanlar fitalatlara duvar kağıtları ve boyalardan inhalasyonla; oyuncak, yiyecek paketleri ve plastik malzemelerden sindirim yoluyla ve deri teması yoluyla hayat boyu maruz kalmaktadırlar. DEHP, DBP, BBP ve DIBP'nin üreme sistemine toksik olduğu bilinmekte ve endokrik bozucu olarak kabul edilmektedir [9]. DEHP, DBP, BBP ve DIBP için belirlenen DNEL değerleri (Derived No-Effect Level in human) DEHP için 25 µg/kg vücut ağırlığı/gün, DBP için 6,7 µg/kg vücut ağırlığı/gün, BBP için 500 µg/kg vücut ağırlığı/gün ve DIBP için 1250 µg/kg vücut ağırlığı/gün olarak

tespit edilmiştir. DNEL değerleri risk değerlendirmesinde en güvenilir bilgi olarak kabul edilmektedir. DINP maddesi de antiandrojenik etkisi bilinmesine rağmen, DEHP, DBP, DIBP ve BBP yerine kullanılabilecek daha az potansiyel antiandrojenik madde olarak belirtilmiş ve bu dört zararlı fitalat maddesinin yerine kullanılması önerilmiştir. DBP Avrupa Komisyonu'nda katalog 1 (canlı organizmalarda endokrin bozucu), fakat yaban hayatı için katalog 3 (bilimsel olarak kanıtsız) olarak sınıflandırılmıştır [9]. DBP'nin östrojenik aktivitesi *in vitro* çalışmalarda gösterilmiş ise de *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir [15]. Jobling ve ark. [16] gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ile yaptığı *in vitro* bir çalışmada, fitalat esterlerinin hepatik östrojen reseptörü için β -östradiol ile yarıştığını rapor etmiştir. Bunun yanı sıra, embriyolojik gelişimsel çalışmaların sonuçlarına göre DBP'nin östrojenik etkiden ziyade antiandrojenik etkisi olduğu düşünülmektedir [17].

Long Evans ratlar ile yapılan bir çalışmada, iki ay süresince günlük 50 mg/kg rat DBP ile maruziyet sonucu gebelik oranlarında, yavru ömürlerinde ve ağırlıkların önemli düşüşler tespit edilmiş, 14 günlük erkek yavrularda kontrollere göre timüs ve testis ağırlıklarında rölatif düşüş ve dişi yavrularda vajinal açıklık ve ilk östrozda gecikme rapor edilmiştir [18]. Tablo 1.2'de kedi balığı (*Pseudobagrus fulvidraco*) ile yapılan bir çalışmada, kronik DBP ve DEHP maruziyeti sonucu tespit edilen vücut ağırlıklarındaki farklılaşma ve kümülatif mortalite değerleri verilmiştir.

Tablo 1.2 Kedi Balığında (*P. fulvidraco*) DBP ve DEHP Maruziyeti Sonucu Vücut Ağırlıklarında ve Ölüm Oranlarında Tespit Edilen Değişimler [19]

Fitalat (mg/kg diyet)		Vücut Ağırlığı (g, ort \pm std. hata)			Kümülatif Mortalite (%)
		Başlangıç	4. Hafta	8. Hafta	
Kontrol	0	54,2 \pm 4,4	86,1 \pm 7,1	106,7 \pm 5,3	0,0
DBP	100	51,9 \pm 3,0	82,5 \pm 5,3	110,6 \pm 5,7	2,0
	500	53,2 \pm 5,6	78,1 \pm 5,1	99,0 \pm 6,0	0,0
	1000	51,8 \pm 4,2	66,4 \pm 6,9	69,5 \pm 8,4	8,0
DEHP	100	51,0 \pm 4,3	81,4 \pm 4,4	91,7 \pm 8,2	2,0
	500	53,4 \pm 2,7	68,1 \pm 4,8	83,2 \pm 6,9	10,0
	1000	52,6 \pm 3,0	70,1 \pm 6,0	74,3 \pm 9,2	14,0

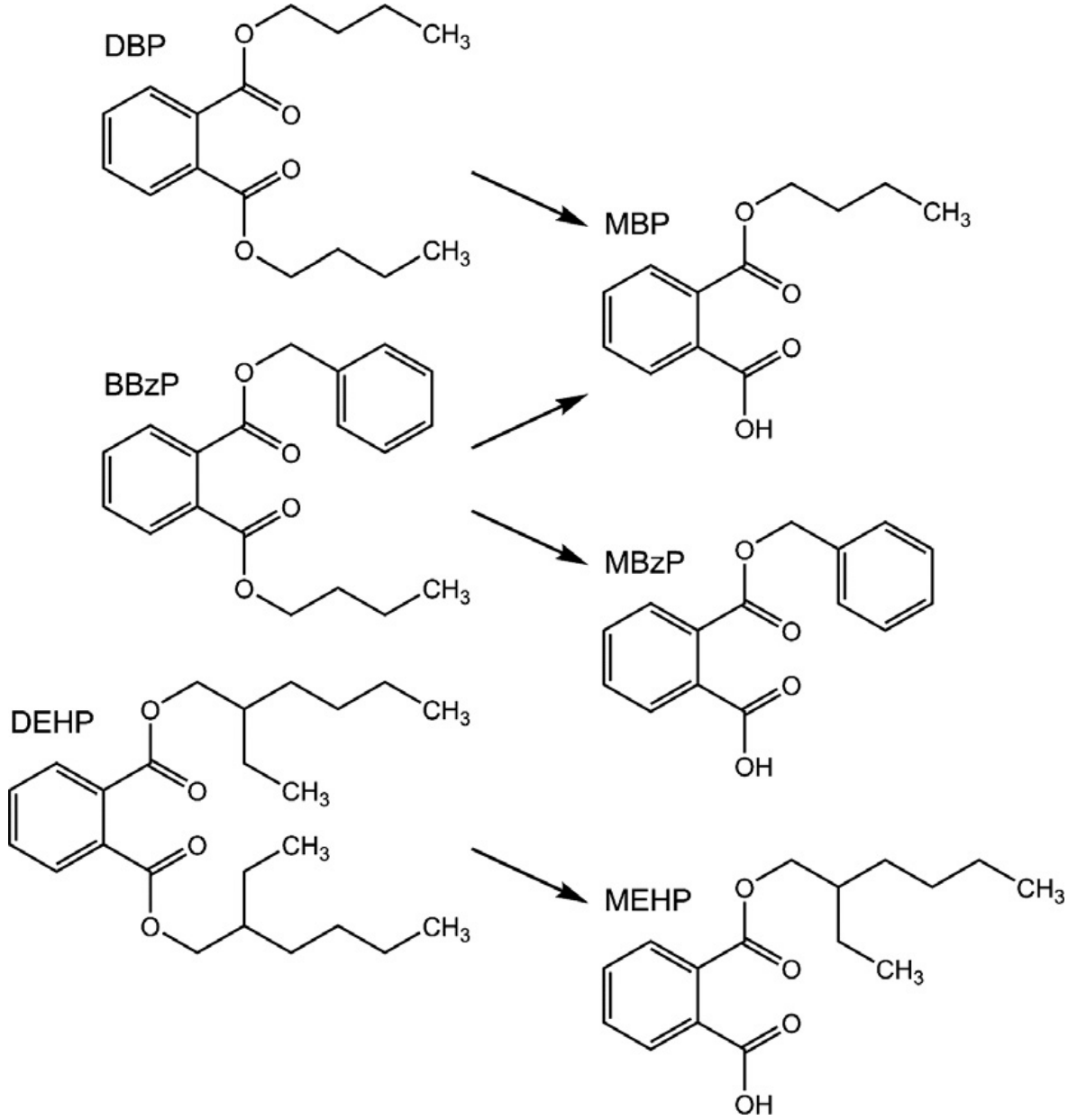
Di-n-bütül fitalat ile çalışılan üretim yerlerinde ve ayrıca evlerde insanlar bu kimyasala hava, besin ve suların kirlenmesi yoluyla, doğrudan ve dolaylı olarak maruz kalabilmektedirler. Gebe sıçanlar, yeni doğum yapan anne sıçanlar ve yeni doğan yavru sıçanlarla yapılan bir maksimum perinatal maruziyet çalışmasında sıçanlara diyet ile DBP verilmiş; gebe sıçanlarda 20.000 ppm DBP ile maruziyette, kontrol grubuna göre anlamlı derecede ağırlık kaybı tespit edilmiş; süt veren anne sıçanlarda ise 10.000 ppm DBP ile maruziyette, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde ağırlık kaybı tespit edilmiş; 20.000 ppm DBP'ye maruz kalan annelerin sütünü içen yavruların 1. günde ölüm oranları %100'ü bulmuş, fakat DBP'ye maruz bırakılmayan kontrol gruplarında yaşama oranı %89 olarak belirlenmiştir. On üç haftalık ergin sıçanlarda, 5.000 ppm ile 40.000 ppm arasında ölüm gözlenmemiş; ancak karaciğer peroksizom sayılarında ve peroksizomal enzim aktivitelerinde, erkek sıçanlarda 13 kata kadar, dişi sıçanlarda da 32 kata kadar artış rapor edilmiştir. Dibütül fitalat *Salmonella* test sisteminde mutajenik bulunmamıştır; ancak L5178Y fare lenfoma hücrelerinde mutasyonları indüklediği rapor edilmiştir [20].

DBP'nin insan üzerindeki toksik etkisi bir klinik vakada gözlenmiştir. DBP ile çalışan bir işçi kaza ile 10 g DBP yutmuş ve korneal epitelyum kaybıyla bilateral keratit, hematuria ve kristaluria ile birlikte geçici nefritis ciddi subakut belirtilerini göstermiştir [20]. [¹⁴C]-dibütül fitalatın intravenöz yolla tek doz uygulandığı sıçanlarda, enjeksiyondan 1 saat sonra hayvana verilen ¹⁴C'ün %6'sı karaciğerde bulunmuş ve organ afinitesi rapor edilmemiştir. *In vitro* çalışmalar sonucu, DBP'nin sıçan karaciğer mikrozom esterazları tarafından MBP'ye çok hızlı hidrolize edildiği ve DBP'nin sıçan karaciğer süksinat dehidrogenazı için güçlü bir inhibitör olduğu ortaya çıkarılmıştır [21]. Bunun yanı sıra, *in vivo* çalışmalar DBP'nin temel olarak ince bağırsakta, karaciğer homojenatlarında, ince bağırsak mukoza hücre homojenatlarında, karaciğer mikrozomlarında, izole edilmiş karaciğer mitokondrilerinde, pankreas, böbrek ve kan homojenatlarında bulunan ve özgün olmayan esterazlar ve lipazlarca mono-n-butül fitalata metabolize edildiğini ve MBP'nin alkil yan zincirinin biyokimyasal oksidasyonu ile sınırlı olduğunu göstermektedir. MBP ikinci ester grubunun hidrolizine karşı dirençli ve stabildir. MBP ve diğer metabolitler glukoronid konjugatları olarak üre ile birlikte vücut dışına atılırlar [22]. Şekil 1.2'de fitalatların genel hidroliz mekanizmaları verilmiştir. Dibütül fitalatın 1 mg'ının hidrolizinden 0,266 mg n-bütanol ve 0,799 mg monobütül

fitalat açığa çıkar. İkincil bütil grubunun hidrolizi önemli miktarda gerçekleşmez. Monobütil fitalatın üretiminin en önemli lokasyonu pankreas tarafından salınan enzimlerin bulunduğu ince bağırsak lümenidir [23]. Hamsterda sıçanlara göre daha fazla miktarda serbest MBP bulunmuş ve hiçbir organda birikme gözlenmemiştir [22]. DBP'nin LD₅₀ konsantrasyonları sıçanlarda inhalasyonla 25 mg/m³, i.p. 3.05 ml/kg [24], i.m. 8 g/kg hesaplanmıştır [25]. Sıçanlarda rapor edilen LD₅₀ konsantrasyonları ise i.p. 4000-7000 mg/kg, farelerde ise 3000-6000 mg/kg; sıçanlarda oral yolla verildiğinde 8000-20000 mg/kg, farelerde ise 5000-16000 mg/kg; tavşanlarda deri yoluyla verildiğinde 4000 mg/kg olarak belirtilmiştir [22].

Laboratuvar hayvanlarıyla yapılan deneyler, sıçanlarda oral ve intravenöz yolla alınan DBP'nin gastrointestinal kanaldan hızlıca absorbe edildiğini, öncelikle karaciğer ve böbreklere dağıtıldığını ve metabolit olarak üre ile dışarı atıldığını, bunun yanında inhalasyonla alındığında ise beyinde sürekli düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir [22].

Anderson ve ark. [26] dizayn ettikleri bir çalışmada insan üresinde bulunan fitalat monoesterleri için kantitatif bir biyomarker metodu geliştirmeye çalışmışlardır. Çalışmada ¹³C-dibütil fitalat (0, 255 veya 510 g) tek dozda gönüllülere verilmiş, konjugatların hidrolizinden sonra ürede bulunan ¹³C-monobütil fitalat miktarı yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi ile ölçülmüş ve ilk 24 saatte dibütil fitalatın %69'unun monobütil fitalat olarak atıldığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, ¹³C-monobütil fitalat ikinci günden sonra tespit edilememiştir. Bu bilgiler ışığında dibütil fitalatın insanda neredeyse tamamen hidrolize edildiği söylenebilir. Serumda total monobütil fitalatın medyan konsantrasyonu 14,4 µg/l olarak tespit edilmiştir; bu miktar serbest monobütil fitalatın yaklaşık %25'idir ve kalanının da monobütil fitalat glukuronid olduğunu göstermektedir [27]. İnsan sütünde monobütil fitalat konsantrasyonu 1,5 µg/l olarak tespit edilmiştir [28]. Anne sütü, tükürük sıvısı ve amniyotik sıvıda serbest monobütil fitalat ve monobütil fitalat glukuronid oranı tespit edilememiştir ve bu bilgi bize monobütil fitalatın insan dokularında çok geniş bir şekilde yayılmış olduğunu düşündürmektedir. Sıçanlarda deri yoluyla verilen tek doz 157 µmol/kg dibütil fitalatın %60'ı 7 günde üre ile birlikte vücut dışına atılmaktadır [29]. Sıçan derisinin insan derisine göre daha geçirgen olduğu rapor edilmiştir [30]. Tablo 1.3'de insan ve sıçan derisinin absorpsiyon hızları verilmiştir.



Şekil 1.2 Fitalatların Genel Hidroliz Mekanizmaları [31]

Gebe sıçanlarda monobütül fitalat ve monobütül fitalat glukuronidin farmakokinetikleri intravenöz monobütül fitalat dozlamasıyla çalışılmış ve bu iki maddenin farmakokinetikleri hızlı bulunmuştur. Monobütül fitalat maternal dokulara çok hızlı bir şekilde yayılmış, 10 mg/kg maruziyette 8. saatten sonra aşırı miktarda konjugat oluşturmuş ve hesaplanan bazı monobütül fitalat farmakokinetik parametleri için geniş değerler hesaplanmıştır [32]. Otuz ve 50 mg/kg monobütül fitalatın vücuttan atılımı için yarı-ömür 1,7 ve 2,6 saat olarak hesaplanmış ve kararlı halde dağılım hacminin 0,51 l ve 0,36 l olduğu bulunmuştur. Ürede

monobütil fitalat ve monobütil fitalat glukuronid dağılımının 1/3 ve 2/3 olarak saptandığı rapor edilmiştir [32].

Tablo 1.3 İnsan ve Sıçan Derisinin Absorpsiyon Hızları [30]

Geçirgenlik sabiti x 10 ⁻⁵ cm/saat ^a		Kararlı Hal Absorpsiyon Hızı (µg/cm ² /saat ^a)		Gecikme Zamanı (saat)	
İnsan	Sıçan	İnsan	Sıçan	İnsan	Sıçan
0,23±0,06	8,95±0,09	0,07±0,02	9,33±0,09	2,9	0,4

^aOrtalama değerler ± Standart Hata

1.3 Fitalatların Protein Sentezi, Gen Ekspresyonu ve Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri

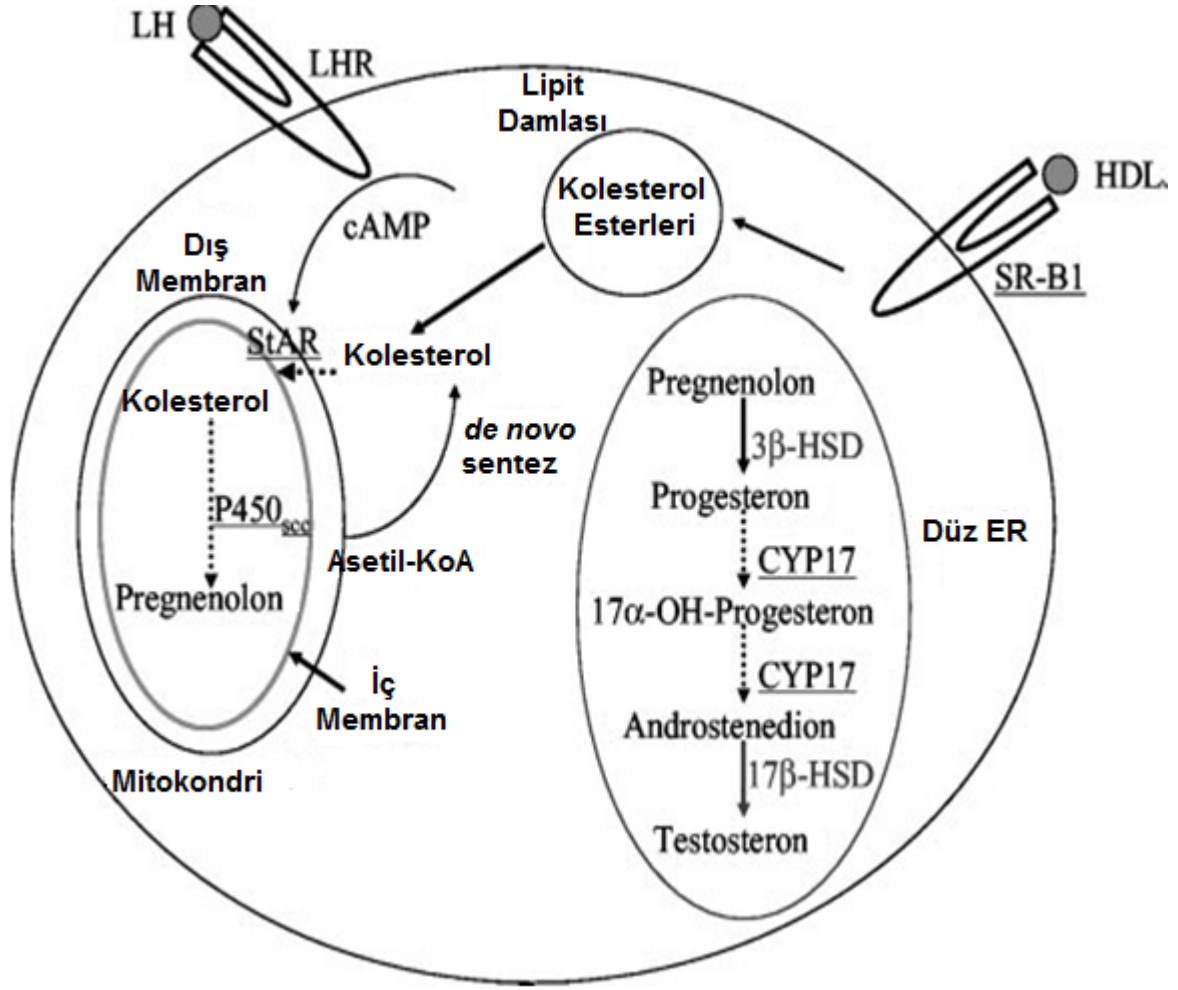
Genç erkek sıçanlarla yapılan bir çalışmada oral yolla 250, 500 ve 1000 mg/kg dibütil fitalat maruziyeti çalışılmış ve 15 günün sonunda 500 ve 1000 mg/kg doz gruplarında testis ağırlıklarında %64 ve %48 azalma tespit edilmiştir. Tüm doz gruplarında histopatolojik inceleme sonucu seminifer tübüllerinde dejenerasyon tespit edilmiş ve sorbitol dehidrogenaz, asit fosfataz gibi postmayotik spermatojenik hücrelerle ilişkili enzimlerde aktivite kaybı rapor edilmiştir. Premayotik spermatojenik hücrelerle ilişkili β-glukuronidaz, γ-glutamil transpeptidaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinde tüm doz gruplarında %67'ye kadar aktivite artışı olduğu gösterilmiş ve en düşük doz grubunda LOAEL (gözlenen-en düşük-ters etki-seviyesi) değeri 250 mg/kg-gün olarak belirlenmiştir [33]. Dibütil fitalatın sıçan karaciğer ve akciğer sitokrom P450 enzimi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada ise, 2, 8, 28 ve 280 mg/kg-gün dibütil fitalat dozlamasında karaciğerde en düşük dozda %48 aktivite artışı ve sitokrom c redüktaz aktivitesinde de %28 artış tespit edilmiştir. Akciğerde ise bu etki gözlenmemiştir [34]. Gebe farelere gebeliğin 12-21. günleri arasında dibütil fitalat 500 mg/kg-gün *in utero* maruziyet olarak uygulanmış ve fetal sıçan testisleri gebeliğin 16-19. günlerinde alınarak sitokrom P450 yan zincir kıvrımında, sitokrom P450c17'de ve steroidojenik akut regülatör proteinde gen ekspresyonu düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Gebeliğin 19. ve 21. günlerinde testiküler testosteron ve androstenedion seviyelerinde azalma gözlenirken, 19. günde progesteron seviyesinde artış tespit edilmiş, testosteron-baskılamalı prostat mesajı-2 (TRPM-2) seviyesinde artış ve kök hücre faktör reseptörü seviyelerinde ise artış rapor edilmiştir [35]. Leydig ve Sertoli hücrelerinde, TRPM-2 ve bcl-2 proteinlerinin

ekspresyon seviyeleri gebeliğin 21. gününde artış göstermiştir. Araştırmacılar, dibütil fitalatın antiandrojenik etkilerinin fetal testiste azalmış testosteron sentezine bağlı olduğunu ve TRPM-2 ve bcl-2 gibi hücrenin hayatta kalmasını sağlayan proteinlerin artmış seviyelerinin dibütil fitalat tarafından indüklenmiş Leydig hücresi hiperplazisi ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Barlow ve ark.'nın [36] dibütil fitalatın testiküler testosteron sentezine gen ekspresyonu düzeyindeki etkilerini inceleyen çalışmaları Shultz ve ark.'nın [35] çalışmalarını doğrulamış ve SRB1 (scavenger reseptör sınıf B-1), StAR (steroidojenik akut regülatör protein), P450 yan zincir kıvrımı, 3 β -HSD (3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz), P450c17 ve c-kit (tirozin kinaz reseptör kök hücre faktörü) ekspresyon seviyelerinde azalma, TRPM-2 ekspresyon seviyelerinde ise artış rapor etmişlerdir. Benzeri çalışmalarla birlikte düşünüldüğünde, dibütil fitalatın fetal testiste gen ekspresyonunda hızlı ve dinamik bir değişimi başlattığı ve steroidogenezin baskılanmasında rol oynadığı anlaşılmaktadır [36], [37]. Şekil 1.3'de testosteron biyosentezi ve dibütil fitalatın sentez yollarına temas noktaları şematize edilmiştir.

Dibütil fitalat Salmonella test sisteminde mutajenik bulunmamıştır [38]. Bunun yanında, DBP S-9 Aroklor indüklü sıçan karaciğer aktivasyon sistemi varlığında L5178Y hücrelerinin kullanıldığı fare lenfomasında mutasyon frekansında önemli artışa neden olmuş, ancak Balb/3T3 hücrelerinde transformasyon frekansını arttırmamıştır [39]. DBP, 2400 mg/kg oral tek doz maruziyette, sıçan testis ve karaciğerinde sitokrom P450A1 mRNA seviyelerinde bir artışa neden olmuş, bu artış PPAR- γ (peroksizom proliferatör-aktifli reseptör- γ) aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir ve ayrıca testiste plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) mRNA seviyelerinde artış gözlenmiştir [40]. On üç hafta boyunca 5.000 ppm ve 20.000 ppm dibütil fitalatla beslenen sıçanlarda karaciğer sitokrom P450C7 mRNA ve protein seviyelerinde 20.000 doz grubunda bir azalma tespit edilmiş, ancak istatistiki olarak anlamlı azalma yalnızca 5. haftadan itibaren gözlenebilmiştir [41]. 5.000 ppm DBP maruziyetinde ise 13. haftada sitokrom P450C7 ekspresyonunda önemli bir azalma rapor edilmiştir [41]. Bunun yanında, 13. haftada sitokrom P450A1, P450A2, P450B1 ve P450A protein ekspresyonlarında artış gözlenmiştir [42]. Dibütil fitalatın karaciğer enzimlerinin sentezlenmesini kontrol eden nükleer reseptörlerin aktivitelerine etkisini araştırmak üzere yapılan bir çalışmada, anne sıçandan ve fetal sıçandan 500 mg/kg-gün DBP maruziyetinin

19. gününde alınan karaciğer dokularında sitokrom P4502B1, P4503A1 ve P4504A1 protein ve mRNA ekspresyon seviyelerinde artış rapor edilmiş; anne sıçanda ayrıca karaciğer östrojen sülfotransferaz ve UDP-glukuronoziltransferaz 2B1 mRNA seviyelerinde artış tespit edilmiştir. Ksenobiyotiklerin varlığında sitokrom P4503A1 ve P4502B1 enzimleri, nükleer reseptörlerden pregnane X reseptör (PXR) ve konstitütif androstan reseptör (CAR) aracılığıyla indüklenirler ve dibütil fitalatın PXR ve CAR üzerinde indükleyici etkisi olduğu bilinmektedir; ancak monobütil fitalatın böyle bir etkisi yoktur. Bu bilgiler ışığında steroid ve ksenobiyotik metabolize eden enzimlerin, en azından fetüsde, dibütil fitalat tarafından indüklendiğini söyleyebiliriz [43].

In vivo çalışmalarla dibütil fitalatın 17 β -östradiol ile östrojen reseptörü için yarıştığı gösterilmiştir. Dibütil fitalat her ne kadar sıçan uterin (dölyatağı) ıslak ağırlığında ve vajinal epitel hücrelerinin keratinizasyon derecesinde önemli bir artışı indüklememiş olsa da, 10 μ M DBP konsantrasyonunda estradiolün 1/3'ü oranında östrojenik aktiviteyi ve bu yolda gen ekspresyonu seviyelerinde artışı indüklemiştir [44]. Dibütil fitalatın 100 μ M konsantrasyonda bile ER α 'ya bağlanmadığı, ancak ER β 'ya, her ne kadar östradiole göre çok daha zayıf olsa da, bağlandığı bilinmektedir [45]. DBP uterus (rahim) ağırlığında ve uterin epitel kalınlığında bir artışa sebep olmasa da, 462,5 mg/kg-gün dozlamasında 3. ayın sonunda endometriyum kalınlığında %40'lık artış tespit edilmiş, fakat miyometriyum kalınlığında ise %30'a varan oranlarda azalma rapor edilmiştir. Uterus ve vajinada ER α ve ER β gen ekspresyonu seviyelerinde bir değişim gözlenmemiş, bunun yanında bir uterin proteini olan kompleman C3 ekspresyonunda anlamlı derecede azalma bildirilmiştir [45]. Doz bağımlı olarak dibütil fitalatın 1000 μ g/ml konsantrasyonunda embriyo gelişimini yavaşlattığı, farklılaşmayı baskıladığı ve orta beyin başta olmak üzere tüm embriyoda sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir [46].



Şekil 1.3 Sıçan Testisinde Testosteron Biosentez Mekanizması [35]. DBP'nin gen ekspresyonunda azalmaya ve aktivite kaybına sebep olduğu enzimler kesikli oklarla gösterilmiştir. Kolesterolde pregnenolon ve pregnenolondan testosteron sentezi P450 enzimlerinin DBP tarafından inhibe edilmesiyle testosteron seviyelerinde azalma görülür.

Mikroarray çalışmalarından gelen sonuçlara göre, akut DBP maruziyeti insan meme epiteli hücrelerinde onkogenlerde ekspresyon düzeyinde değişim ve üreme toksisitesi tespit edilmesinin yanı sıra hücre proliferasyonu ve sinyal iletiminde de bozukluklar saptanmıştır [47]. Akut DBP maruziyeti sonucu gebelik zehirlenmesi riskinde de artış görülebilmektedir [48]. Akut DBP maruziyeti Comet deneyi ile analiz edilmiş ve mukoza ve lenfosit hücrelerinde bir saatlik maruziyet sonucu genotoksisiteye sebebiyet verdiği bildirilmiştir [49].

cDNA mikroarray (Estrarray) kullanılarak östrojen cevabı oluşturan 172 genin regülasyonu araştırılmış ve fitallerle maruziyet sonucu 108 genin ekspresyon seviyelerinin arttığı, 64 genin ise ekspresyon seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücreleri 10'ar μM BBP, DBP, DEP ve DIP doz grupları olarak muamele

edilmiş ve 3 günlük maruziyet sonucu gen ekspresyon profili çıkarılmıştır. Ekspresyon profilinde r değerleri (korelasyon katsayısı) ve cluster analizi (genlerin takım olarak analizi) kullanılmış; DBP, E2 muamelesi ile önemli derecede korelasyon göstermiştir. DBP'nin DHCR (24-dehidrokolesterol redüktaz) gen ekspresyonunda 0,24 kat değişime ve HSPA1A (Heat Shock Protein 1A) ekspresyonunda ise 0,66 kat değişime sebep olduğu rapor edilmiştir [50].

Dibütil fitalat, dietilhekzil fitalat ve bütilbenzil fitalat fetal sıçanda seksüel gelişimi etkilemekte, ancak dimetil filalat ve dietil fitalat böyle bir etki yapmamaktadır [15]. DBP, DEHP, BBP, DMP ve DEP ile 500 mg/kg-gün dozlamalarında fetal testislerde gebeliğin 12 ve 19. günleri arasında MMP ve MEP seviyeleri, MBP ve MEHP seviyelerine göre 2-40 kat arası yüksek olduğu tespit edilmiş; BBP maruziyeti sonucu düşük konsantrasyonda MBeP ve buna benzer olarak DBP maruziyeti sonucu da düşük konsantrasyonda MBP rapor edilmiştir [15]. *In vitro* MA-10 hücre deneyinde 1 µM MEHP maruziyetinin LH ile indüklenen testosteron sentezini inhibe ettiği gösterilmiş, kolesterol transportu, steroid sentezi ve metabolizmasıyla ilişkili genlerin ise regülasyonunda inhibisyon etkisi RT-PCR deneyiyle gösterilmiştir [15]. Dişi sıçanlarda ise gebeliğin 12-20. günleri arasında 100 mg/kg-gün DBP dozlamasında fetal ağırlıkta artış tespit edilmiş, ancak bu artış doğumda yavru ağırlığını etkilememiştir ve DBP'nin dişi sıçanların üreme gelişimi ve fonksiyonunu bozmadığı şeklinde yorumlanmıştır [51]. Buna rağmen DEHP ve DBP maruziyetinin yetişkin dişi sıçanlarda östrus döngülerini uzatıp, östradiol seviyelerini düşürdüğü ve ovulasyonu engellediği; buna bağlı olarak da sonuçta polikistik ovarı sendromuna sebep oldukları bildirilmiştir [52]. Kim ve ark.'nın [53] yaptığı bir çalışmada ise DBP'nin fungusit ve pestisitlerle benzer şekilde genel bir toksikogenomik etkiye sahip olduğu ortaya çıkarılmış ve apoptoz, stres yanıtı, germinal hücre gelişimi, kofaktör metabolizması ve lipid metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyon seviyelerinde anlamlı değişimler rapor edilmiştir.

Fitalat esterlerinin üreme gelişiminde genel cevap oluşturma potansiyeli en yüksek DEHP maruziyeti ile ve en düşük ise BBP maruziyeti ile görülmektedir [54]. Fitalatların *in utero* maruziyeti sonucu F1 dölü erkek sıçanlarda androjen-aracılıklı gelişimde karakteristik bir bozukluk görülür ve bu sendrom epididimis, vas deferens, seminal keseler ve prostatta malformasyonlara, bununla birlikte dışsal

genitalya (hipospadias), kriptorkidizm, testiküler hasar, dimorfik seksüel yapılar ve anogenital aralıkta indirgenmeyle sonuçlanan perineum büyümesinin demaskülinizasyonuna neden olur [54]. Daha da önemlisi *in utero* DBP maruziyeti sonucu 3 aylık erkek sıçanlarda Leydig hücre adenoması tespit edilmiştir [55]. Diğer *in utero* çalışmalarda 750 mg/kg-gün DEHP ve 1000'er mg/kg-gün DBP ve BBP doz gruplarında Leydig hücrelerinin bir ürünü olan insülin-benzeri faktör 3 proteininin (gübernaküler ligament gelişiminden sorumlu bir hormon) ekspresyonunda ve fetal testosteron seviyelerinde azalma rapor edilmiştir [56], [57]. DBP ve DEHP maddelerinin kümülatif etkisini anlamak için DBP ve DEHP birlikte verildiğinde erkek yavrularda areola büyüklüğü, DBP ve DEHP'nin tek tek dozlandığı gruplardaki erkek yavruların areola büyüklüklerine göre en az %50 artış gözlenmiştir ve bu değer kontrol grubuna göre %100 artışa karşılık gelmektedir. Ayrıca DBP ve DEHP'nin testiküler ve gübernaküler malformasyonda ve epididimal agenesiste kümülatif etkisi %75'e varan oranlarda tespit edilmiştir. DEHP ile dozlamada %75 oranında inhibisyon görülen StAR mRNA ekspresyonu, DEHP ve DBP birlikte dozlandığında %81 oranında inhibe olmaktadır. CYP11A ekspresyonunda anlamlı bir inhibisyon ise yalnızca DBP ve DEHP birlikte verildiğinde gözlenmiştir [58].

DBP maruziyeti sonucu MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinde ve MCF10A hücrelerinde metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi kullanılarak insan östrojen reseptör geninin promotor bölgesinde DNA hipometilasyonu incelenmiş ve 10^{-5} M DBP dozlamasında ER α promotor bölgesinde demetilasyon tespit edilmiştir. Benzer etki aynı dozda BBP maruziyetinde de tespit edilmiş ve DBP ve BBP ile indüklenen DNA hipometilasyon veya demetilasyonun, ER α promotor bölgesinde CpG-adası ile ilişkili gen ekspresyonunun modülasyonuna yol açabileceği öne sürülmüştür [59]. Epigenetik bir modifikasyon olan DNA metilasyonunun memeli hücrelerinde transkripsiyonel susturma ile ilişkili olduğu bilinmektedir [60]. Prostat ve meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptörü gen fonksiyonunun bozulmasına promotor CpG adalarının hipermetilasyonunun neden olduğu bilinmektedir [61], [62]. DBP ve BBP maddelerinin üreme sistemi gelişimi üzerinde toksik etki oluşturması ve bununla birlikte antiandrojenik etkisi östrojen reseptörü promotor bölgesinde CpG adalarının hipometilasyonu ile ilişkilendirilebilir.

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada DBP, DEHP ve DEHA (diethylhexil adipat) maddeleriyle maruziyet sonrasında laurat 12 hidroksilaz aktivitesinde 10 kat aktivite artışı gözlenmiş, ayrıca DEHP doz grubunda peroksizomal palmitoil-KoA oksidasyonunda 6 kat artış saptandığı bildirilmiştir [63]. Deksametazon ve 100 mg/kg DBP birlikte dozlandığında sıçanlarda doğum oranında %20'lere varan azalma gözlenmiş, deksametazon ve DBP'nin tek tek dozlandığında görülen doğum oranında azalmaya göre anlamlı bir fark bulunmuştur. 100 mg/kg DBP veya deksametazon tek tek uygulandığında testis ağırlığı ve ventral prostat ağırlığında değişme gözlenmezken, 500 mg/kg DBP dozlamasında bu iki parametrede ve fetal testiküler ITT, StAR ve CYP11A1 mRNA seviyelerinde önemli derecede azalma tespit edilmiş; bunun yanında 500 mg/kg DBP ile deksametazon kombine dozlandığında ITT, StAR ve CYP11A1 mRNA ekspresyonunda çok daha ciddi düzeyde baskılanma olduğu bildirilmiştir [64].

Yetişkin erkek sıçanlarda EDS (etan dimetan sülfonat) dozlamasını takiben 2. ve 4. günlerde DBP maruziyeti sonucu testiste Leydig hücre farklılaşması etkilenmiş, bu etki genel olarak erken Leydig hücre proliferasyonunda tespit edilmiştir ve erken farklılaşmayı da geciktirmiş olma ihtimali çok yüksektir [65]. EDS dozlamasını takiben, farklılaşmanın en belirgin olduğu 27. günde DBP Leydig hücre yoğunluğunda 4 kat artışa neden olmuş ve Leydig hücrelerine özgün INSL3, LH reseptörü, CYP17A1 ve CYP11A1 marker transkriptlerinde önemli bir artış gözlenmiştir [64]. Bunun yanında 14. ve 27. günlerde StAR gen ekspresyonunda önemli bir artış gözlenmiş ve benzer olarak başka bir Leydig hücre markırı olan 17bHSD10 ekspresyonunda 14. günde anlamlı bir artıştan sonra önemli bir varyasyon tespit edilmiştir. 27. günde ise Leydig hücre transkripsiyon faktörü Nr4a1 ekspresyonunda anlamlı bir azalma olduğu rapor edilmiştir [65]. Ayrıca gebe Wistar sıçanlarda diyetle birlikte DBP maruziyetinin yeni doğan yavrularda öğrenme bozukluğu ve hafıza kaybına yol açtığı ve bu negatif etkilerin erkek sıçan yavrularda dişilere göre daha yüksek görüldüğü bilinmektedir [66].

DBP fetal ve neonatal erkek farelerde testiküler testosteron seviyelerini düşürmekte ve bu düşüş kolesterol transportu ve testosteron sentezinde görev alan genlerin ekspresyonunun inhibe edilmesiyle ilişkilendirilmektedir. Testosteron sentezinde görevli enzimlerin aktivitelerindeki değişimler aril hidrokarbon reseptörünün ksenobiyotikler aracılığıyla modülasyonundan da

kaynaklanabilmektedir [67]. Struve ve ark.'nın [68] yaptığı bir çalışmada Scarb1, CYP11A1 ve CYP17A1 proteinlerinin fetal testiküler ekspresyonunda *in utero* 500 mg/kg-gün DBP maruziyeti ile 24. saatte anlamlı azalma tespit edilmiş, erken tepki genlerinden B-hücreli translokasyon geni 2, endotelial farklılaşma sfingolipid G-protein-çiftlenmiş reseptörü 3 ve stanniokalsin 1 gen ekspresyonlarında önemli derecede artış rapor edilmiştir.

DBP endokrin bozucu ftalatlardan ikinci en yaygın bulunanıdır ve diğer ftalatlar sadece anti-androjen etkiye sahip olmasına rağmen, DBP diğer ftalatlara kıyasla aynı zamanda östrojenik etki de gösterebilmekte, dişilerde üreme sistemini bozmakta ve üreme olgunluğunu önlemektedir. DBP dişi sıçanlarda da ER α mRNA seviyelerini doz ve süre bağımlı (kronik maruziyet) olarak arttırmakta, ancak maruziyetin ardından geri kazanım periyodunda ER α mRNA seviyeleri normale dönmektedir [69].

1.4 Ftalatların Sucul Organizmalar Üzerine Toksik Etkileri ve Tetkik Yöntemleri

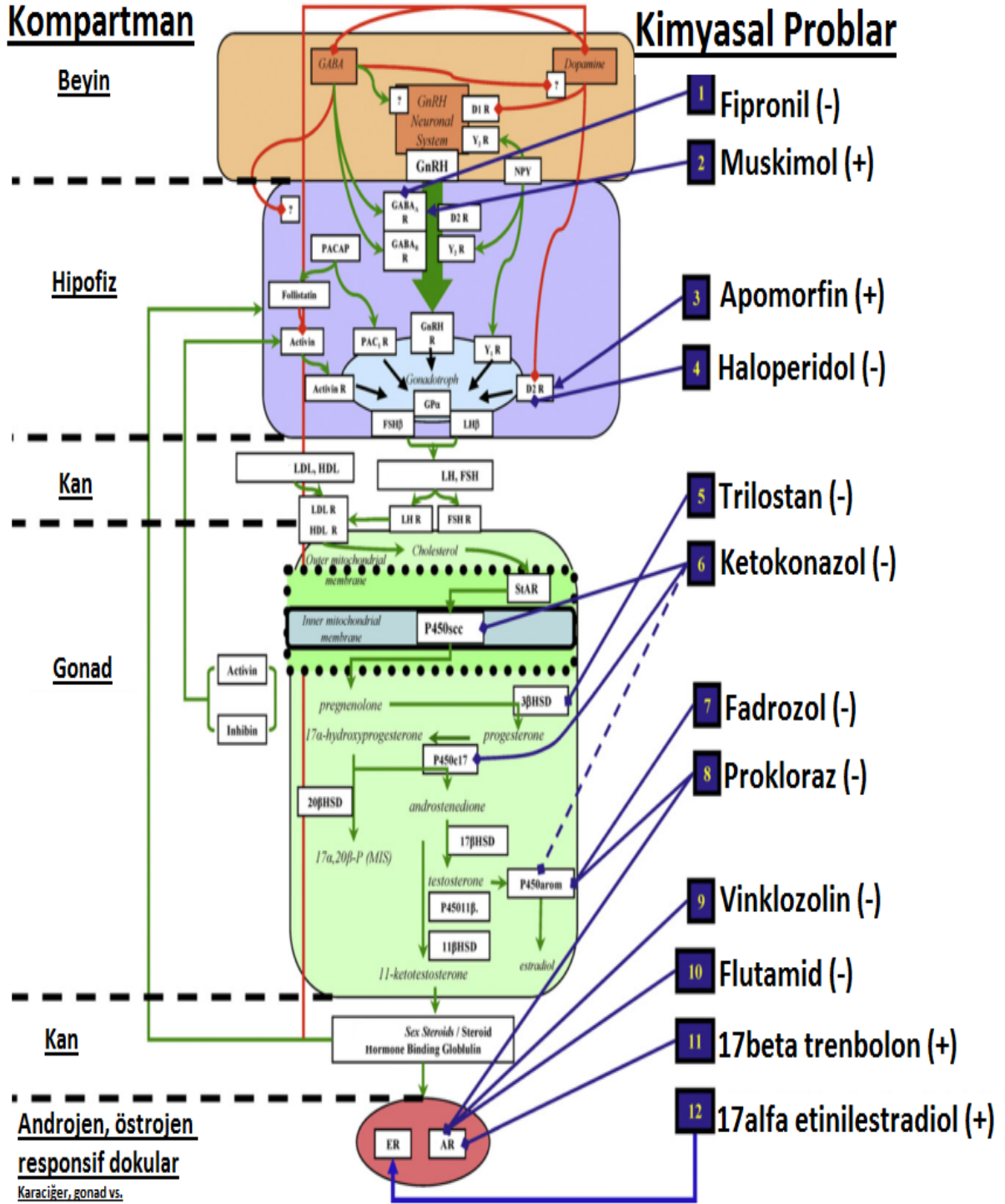
Sanayi atıklarının temiz sulara, içme sularına, deniz ve nehirlerle karışması, başta balıklar olmak üzere, algler, kerevitler ve *Daphnia magna* gibi sucul mikroorganizmaları da etkilemekte ve bioakümülyasyona neden olmaktadır [70]–[72]. Avrupa'da DBP'nin PEC (Priority Existing Chemicals: Öncelikli Kimyasallar) raporlarına göre tatlı su ve sedimentlerde biriken miktarları 0,4 mg/l ve 0,231 mg/kg olarak belirtilmiştir [5]. DBP'nin tatlı sularda biriken miktarları endüstrinin daha yaygın olduğu İngiltere gibi ülkelerde ise 33,5 mg/l'ye kadar çıkabilmektedir. Almanya ve Japonya gibi ülkelerde ise tatlı sularda biriken miktarlar 98 mg/l olarak tespit edilmiştir [3].

Toprak solucanı (*Eisenia fetida*) ile yapılan bir çalışmada DBP ve DEHP gibi yüksek molekül ağırlıklı ftalatların vücut tarafından absorbe edildiği ve toksik etki oluşturduğu, ancak diğer ftalatlara göre daha düşük bioakümülyasyon değerlerine sahip oldukları, bunun yanında DMP ve DEP gibi ftalatların ise absorpsiyonunun daha düşük bulunduğu bildirilmiştir [73]. DEHP'nin 70-500 mg/l konsantrasyon aralığında Diptera larvalarında HSP70 (Isı Şoku Proteini-70) ve hemoglobin genlerinin ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir [74]. Vertebrata'da ısı şoku proteinlerinin steroid hormon reseptör aktivasyonu ve stabilizasyonu ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [75]. *Pimephales promelas*'da 100 mg/l BBP

maruziyetinde vitellogenin proteininin indüklendiği ve östrojenik aktivitenin arttığı, sazan balığında (*C. carpio*) ise 20 mg/l DEP maruziyetinde vitellogenin sentezinin arttığı bildirilmiştir [76], [77]. DEHP ve DBP sazan balığında steroid hormon sentezi ve metabolizmasını bozarak androjen-östrojen dengesini değiştirebilmekte ve tüm üreme sisteminde hasar bırakabilmektedir. Fitalatların vitellogenin sentezini indükleyebilmesi, vitellogeninin, regülasyonundaki anormal değişimlerin izlenerek çevresel kirlenici fitalatlar için markır potansiyeli olduğunu göstermektedir [78].

Kimyasalların prospektif ekolojik risk değerlendirmelerinde genellikle toksik etki mekanizması hakkında üretilen bilgiler/veriler sınırlıdır. Ekolojik etkileri saptamak için geliştirilen test yöntemleri çok çeşitli canlı türlerinde uygulanır ve son nokta etkileri incelemeyi kapsar. Etki mekanizmasının bilinmesi, kontaminant maddenin çevresel konsantrasyonların ve dozlamaları belirlenmesinde kullanılabilir, strese neden olan ve strese özgü moleküler indikatörlerin tanımlanmasını sağlayacaktır. Bununla birlikte, aksiyon mekanizmasının bilinmesi türler arası biyolojik etkilerin tahmin edilmesi, kimyasal yapı ve biyolojik organizasyon seviyelerinin etkili bir şekilde anlaşılabilmesi ve tepki hassasiyetinin, zaman ve kaynak kullanımının belirlenmesine olanak sağlayabilir [79]. Endokrin bozucu kimyasalların belirlenmesinde mekanistik yaklaşımlar için teknolojik gelişmelerden, genomik ve matematiksel biyolojiden yararlanılarak, organizmalardaki stres bağımlı ve ters tepkiler için önceden çıkarım yapma ve doz belirleme gibi araştırmacının kullanımına sunulabilecek yararlı bilgiler oluşturulabilir [80]–[83]. Şekil 1.4’de balıkta deneysel kimyasal problemlerle farklı etki mekanizmaları hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninde gösterilmiştir.

Atık sularda bulunan kimyasal maddelerin çoğu östrojen reseptörü ile etkileşime girebilmektedir. *In vitro* çalışmalar fitalatların östrojen reseptörü (ER), aril hidrokarbon reseptörü (AhR), androjen reseptörü (AR) ve tiroid hormon reseptörü (TR) üzerine farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Çoğu AhR ligandı sitokrom P450 1A alt ailesinin aynı zamanda substratıdır. Substratın inhibisyonu sonucu EROD (etoksirezorufin-O-deetilaz) aktivitesindeki değişimler dioksin ve benzeri bileşiklerle maruziyet konusunda araştırmacıya fikir verebilmektedir [84]. Sitokrom P450 1A ailesi atık sularda, iç sular ve hatta deniz canlılarında kirlilik hususunda bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [85]–[87].



Şekil 1.4 Balıkta Hipotalamus-Hipofiz-Gonad Ekseninde Kimyasal Problemlere Özgü Etki Mekanizmaları [79] . Parantez içindeki “+” ve “-” işaretleri indüksiyon veya inhibisyonu belirtmektedir.

Toksikoloji, farmakoloji ve çevre bilimlerinde bir kimyasalın bir canlı organizma üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla bazı parametreler kullanılır. Bunlar EC₅₀ (etken konsantrasyon 50), IC₅₀ (inhibitör konsantrasyon 50), LD₅₀ (ortalama öldürücü doz) gibi kimyasal ya da patojenlerin etkin dozlarının belirlenmesini sağlayan referans bilgilerdir. EC₅₀ belirli bir zaman aralığında bir kimyasalın veya ilacın bir canlı popülasyonunun yarısını öldürebildiği konsantrasyonu olarak tanımlanırken, IC₅₀ bir kimyasalın veya ilacın *in vitro* olarak biyolojik bir fonksiyonda %50 inhibisyon gerçekleştirdiği konsantrasyonu belirtir. EC₅₀/IC₅₀ değeri genelde ilaçların biyoaktivite değerlendirmelerinde kullanılır [88]. LD₅₀ ise bir kimyasal veya patojenin bir canlı popülasyonunun yarısını öldürdüğü dozdur ve birimi genellikle “mg (kimyasal)/kg (vücut ağırlığı)” olarak alınır; ayrıca bu birime zaman periyodu eklenirse birim “mg/kg-gün” olarak değişir. LD₅₀ toksikoloji çalışmalarında ve yaygın olarak laboratuvar sıçanlarında akut toksisiteyi belirlemede kullanılır. LD₅₀ değerleri standart değerler olduğundan, kimyasallar arasında rölatif toksisite veya türler arası toksisite farkları LD₅₀ değerleri kullanılarak belirlenebilir [89]. Bunların yanı sıra, NOEC (etki görülmeyen konsantrasyon) ve LOEC (en düşük etki görülen konsantrasyon) değerleri de kullanılmaktadır. NOEC ve LOEC, kullanılan metodun tetkik limitlerini belirlemede araştırmacılara yardımcı olurlar [90]. Biokonsantrasyon faktörü (BCF) ise su kaynaklı bir kimyasal maddenin balık ya da sucul bir organizmanın yağ dokusunda birikebilme ölçüsü olarak tanımlanır [91]. Dibütil fitalatın, araştırmacıların belirlediği zaman aralığında balıklar ve bazı sucul organizmalarda gözlenen NOEC-LOEC, EC₅₀ ve son nokta analizleri Tablo 1.4’de verilmiştir. *Tetrahymena thermophila*’da DMP, DEP ve DBP’nin EC₅₀ değerleri sırasıyla 537 mg/l, 132 mg/l ve 7 mg/l olarak bulunmuş [92], DBP’nin türler arası hesaplanan EC₅₀ değerleri ise kırmızı yıllık balığı (*Fundulopanchax gardneri*) için 4,3 mg/l, zebra balığı (*Danio rerio*) için 2,2 mg/l, sarı tatlı su levreği (*Perca flavescens*) için 0,35 mg/l [2]; DBP’nin bazı türlerde NOEC değerleri ise çamur yengeci (*Scylla serrata*) için 1 mg/l, koca golyan balığı (*P. promelas*) için 0,56 mg/l, *Daphnia magna* için 0,56 mg/l olarak hesaplanmıştır [71]. Kanada Çevre Koruma Konseyi’nin raporuna göre fitalatların sarı tatlı su levreği (*Perca flavescens*), alabalık (*Oncorhynchus mykiss*), ay balığı (*Mola mola*), kedi balığı (*Pseudobagrus fulvidraco*) ve *P. promelas* için 96 saat LC₅₀ değerleri 0,35 ile 3,96 mg/l arasında değişmektedir. *D. magna*’da 7 günün sonunda DBP için hesaplanan BCF değeri 400, *Hexagenia bilineata*’da 430, *G.*

pseudolimneaus'da 1400, *P. promelas*'da 580-2080 arasındadır [8]. Sazan balığına (*C. carpio*) 28 gün sürdürülen 10 µg/l ve 50 µg/l DBP maruziyeti sonucunda BCF değeri 1,8 l/kg hesaplanmıştır [5].

Tablo 1.4 DBP'nin Bazı Sucul Organizmalarda Tespit Edilen Toksikolojik Parametreleri [2]

Test Edilen Tür	Test Süresi	Son Nokta veya Kriter	EC50 mg/l	NOEC (LOEC) mg/l
<i>D. magna</i>	48 saat	Ölüm	3	1,7
<i>C. carpio</i>	43 saat	Ölüm	-	74-159 mg/kg v.a*
<i>O. mykiss</i>	96 saat	Ölüm	1,6	0,5
<i>P. flavescens</i>	96 saat	Ölüm	0,35	-
<i>P. promelas</i>	48 saat	Ölüm	1,49	-
<i>O. latipes</i>	48 saat	Ölüm	4,3	-
<i>B. rerio</i>	96 saat	Ölüm	2,2	1,3
<i>C. variegatus</i>	96 sat	Ölüm	>0,6	0,6
<i>C. auratus</i>	-	Kalp atış hızı değişimi	-	0,5
<i>I. punctatus</i>	96 saat	Ölüm	2,91	-
<i>K. sandvicensis</i>	2 dk	Ölüm	-	10
<i>T. pyriformis</i>	24 saat	Büyüme inhibisyonu	-	1
<i>P. putida</i>	30 dk	Solunum inhibisyonu	-	2500
<i>S. subspicatus</i>	72 saat	Büyümede hızlanma	2	0,5
<i>C. plumosus</i>	48 saat	Ölüm	0,76	-

*: Vücut ağırlığı

Sazan balığı ve fitalatlarla yapılan bazı *in vitro* çalışmalarda, 1000 nM DEHP dozlamasında sazan balığı böbreğinde fagositik hücrelerde süperoksit anyonunun üretiminde ve fagositik aktivitede artış; DBP ile DEHP maruziyetinin ise sazan balığı makrofajlarında nitrik oksit üretimini arttırdığı rapor edilmiştir [93]. Genel olarak fitalatların *in vitro* çalışmalarda hepatik östrojen reseptörü için β-östradiol ile yarıştığı bilinmektedir ve immün sistem hücrelerinden olan makrofaj ve lenfositlerin de östrojenik reseptörlere sahip olması, kortizol, östrojen, büyüme hormonu gibi hormonlarla yarışabilen çevresel kontaminant endokrin bozucuların balık immün sistemini olumsuz etkileyeceği söylenebilir [93].

1.5 Organizmada Oluşan Stres Yanıtı

Bugüne kadar varlığını bildiğimiz tüm canlı organizmalar bir iç denge (homeostaz) halinde normal yaşantılarını sürdürürler. İç dengeyi sağlayabilmek ve yaşamaya devam edebilmek için, canlıda oluşan stres unsurlarıyla başa çıkılabilmesi gerekmektedir [94]. Stres faktörleri iç ve dış kaynaklı olabilirler. Bunlar fizyolojik, metabolik, patofizyolojik (enflamasyon, enfeksiyon, yaralanma vs.), oksidatif ve çevresel stres faktörleri olarak sıralanabilir. Çevresel stres faktörleri genel olarak ksenobiyotik olarak adlandırdığımız ve organizmaya dışarıdan giren herhangi yabancı bir madde olabileceği gibi, sıcaklık, ışık, işitsel ve görsel stres de çevresel stres faktörleri olarak sıralanabilir [95]. Günlük yaşamda hayatımıza giren her türlü kimyasal ajan, tarımda kullanılan herbisit ve insektisitler (pestisitler), ilaç etken maddeleri ve dolgu maddeleri, kozmetik ürünleri, plastik ve kaplama malzemelerinden bulaşan ve absorbe edilen fitalatlar, UV radyasyon, γ -radyasyon, çevresel tuzlanma, dioksinler, bisfenoller, benzen, fenil ve türevleri, hidrokarbon bileşikleri, karsinojen alkaloidler bunlar arasında sayılabilir. Tablo 1.5'de stres yanıtında kimyasal indükleyiciler ve hedef genleri verilmiştir. Organizmanın stres yanıtı stres faktörünün tipine ve ciddiyetine göre değişir. Stres faktörünün ciddiyetine göre, hücre ya apoptoz yolunu ya da hücrenin yaşamasını sürdürebilmesi amacıyla korumacı hücresel yanıtı seçebilir. Hücrenin strese karşı oluşturacağı cevap ısı şoku yanıtı, katlanmamış protein yanıtı, DNA hasarı yanıtı ve oksidatif strese karşı yanıt olarak sıralanabilir [96]. Isı şoku cevabı başlıca stres cevaplarından biridir ve 35°C'nin üzerinde (balıklarda 20-25°C) indüklenebileceği gibi, kimyasal stres, oksidatif stres ve metal maruziyetine karşı da oluşabilir [97]. Oksidatif stres yanıtı, hem metabolizmanın normal aerobik fonksiyonu sırasında üretilen, hem de dış kaynaklı kimyasal ajanların enzimatik indirgenmesi sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS: reactive oxygen species) hücreyi tehdit edici boyutlarda sentezlenmesine karşı evrimleşmiş bir hücresel koruma tepkisidir [98]. Reaktif oksijen türleri metabolizma tarafından elimine edilemeyecek boyutlarda miktarca artıp biriktiğinde DNA, protein ve lipitlere ciddi zararlar verebilir, DNA'ya bağlanarak kanser gelişiminde rol oynayabilir. Reaktif oksijen türleri enzimatik olmayan glutatyon, vitamin A, C, E ve flavonoid moleküller yardımıyla zararsız hale getirilebileceği gibi, ROS'ların süpürücüsü olarak adlandırılan enzimatik radikal temizleyiciler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından da etkisiz hale getirilebilir [98], [99].

Tablo 1.5 Organizmanın Stres Yanıtında Hedef Genler ve Kimyasal İndükleyiciler [100]

Stress Yanıtı	Hedef Genler	Kimyasal İndükleyiciler
Isı şoku yanıtı	Hsp70, Hsp90, Hsp60, Hsp26, Hsp27, Hsp23	Pestisitler, ağır metaller, endüstriyel atıklar, mono ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar
Oksidatif stres	SOD, Katalaz, Tioredoksin, Peroksiredoksin	Ağır metaller, kininler, organik çözücüler
DNA hasar yanıtı	p53, RecA/Rad51, MutL/MLH, MutS/MSH	Pestisitler, metil metansülfonat ve siklofosamid
Metal stresi	Metallotiyonein	Ağır metaller
İnflamasyon	NF- κ B, STAT3, AP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6	Metaller, poliklorine bifeniller, eksoz partikülleri, duman partikülleri
Hipoksiya	P38, p13k	Metaller ve quersetin
Ksenobiyotik metabolizması	P450, GSH sistemi	Pestisitler, ağır metaller, organik çözücüler, alkaloidler, kafein

1.5.1 Isı Şoku Yanıtı

Stres, homeostazı bozan etkenlere maruziyetten sonra iç dengeyi tekrar sağlamak için organizmanın fizyolojik yanıtlarının bir toplamı olarak tanımlanabilir [96]. Bu stres yanıtının bir parçası olarak, stres genleri olarak belirlenen bir gen seti ısı şoku proteinleri (Hsp'ler: Heat shock proteins) olarak adlandırılan bir grup proteinin sentezini indükler. Hsp'ler, stres bağımlı olarak yanlış katlanan ya da yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmasını sağlayan ve agregasyonunu engelleyen moleküler şaperonlar olarak rol oynarlar [100]. En az şiddetli stres koşullarında bile hassas olmalarından dolayı hücrel hasarın erken uyarıcı biyobelirteci olarak değerlendirilmek için uygundur [101], [102].

Isı şoku proteinlerinin ilk olarak keşfedilmesi, meyve sineğinin akut ısı şokuna maruz kalmasının ardından tükrük bezi hücrelerinde kromozomal kabartıların görüntülenmesi şeklinde gerçekleşmiştir [97]. Isı şoku proteinleri moleküler büyüklüklerine göre gruplandırılırlar ve bunlar genel olarak Hsp110, Hsp100,

Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp56, mtHsp75, Hsp104 aileleri ve küçük Hsp'lerdir. Hsp100 ailesi evrimsel olarak korunan AAA domainlerine göre iki sınıfa ayrılır. Sınıf 1 Hsp100'ler her monomerinde iki farklı nükleotit bağlanma bölgesi bulunan dinamik heksamerik proteinlerdir. Sınıf 2 Hsp100 proteinlerinde ise yalnızca bir nükleotit bağlanma modülü bulunur. Hsp100 proteinlerinin yanlış katlanmış proteinleri heksamerik halkalarının merkezi poru sayesinde çekerek tekrar katlanmalarını sağladığı düşünülmektedir [103]. Hsp70 ve Hsp100 proteinlerin doğru katlanmasından sorumlu temel proteinlerdir. Bunun yanında, ATP'den bağımsız çalışan şaperonlar olan küçük Hsp'ler ise stresle denatürasyonu indüklenmiş proteinlerin agregasyonunu engellerler ve Hsp70 ve Hsp100 varlığında tekrar katlanması gerçekleştirilecek denatüre olmuş proteinlerin depolanma yeri vazifesi görürler [103], [104]. Hsp70 evrimsel olarak en iyi korunmuş ısı şoku proteinlerindedir ve prokaryotlardaki karşılığı DnaK, ökaryot Hsp70 proteini ile %60 sekans benzerliği gösterir. Hsp70'in iki domaini vardır; birisi ATPaz, diğeri ise protein bağlama domainidir. Bağlanma yüzünde yedi hidrofobik amino asit bulunur. Hsp70'in, denatüre olmuş polipeptit segmentleriyle etkileşimi ATP bağımlıdır ve ADP posthidrolize durumundayken substratıyla bağlanabilmektedir [103]. Hsp70'i regüle eden kofaktörler bir grup Hsp40/J-domain içeren proteinlerdir ve denatüre olmuş proteine bağlanarak Hsp70'e ulaştırırlar [103]. Bu kofaktörlere nükleotit değiştiren faktörler adı verilmiştir [100]. Hsp'lerin lokasyonları ve görevleri Tablo 1.6'da açıklanmıştır.

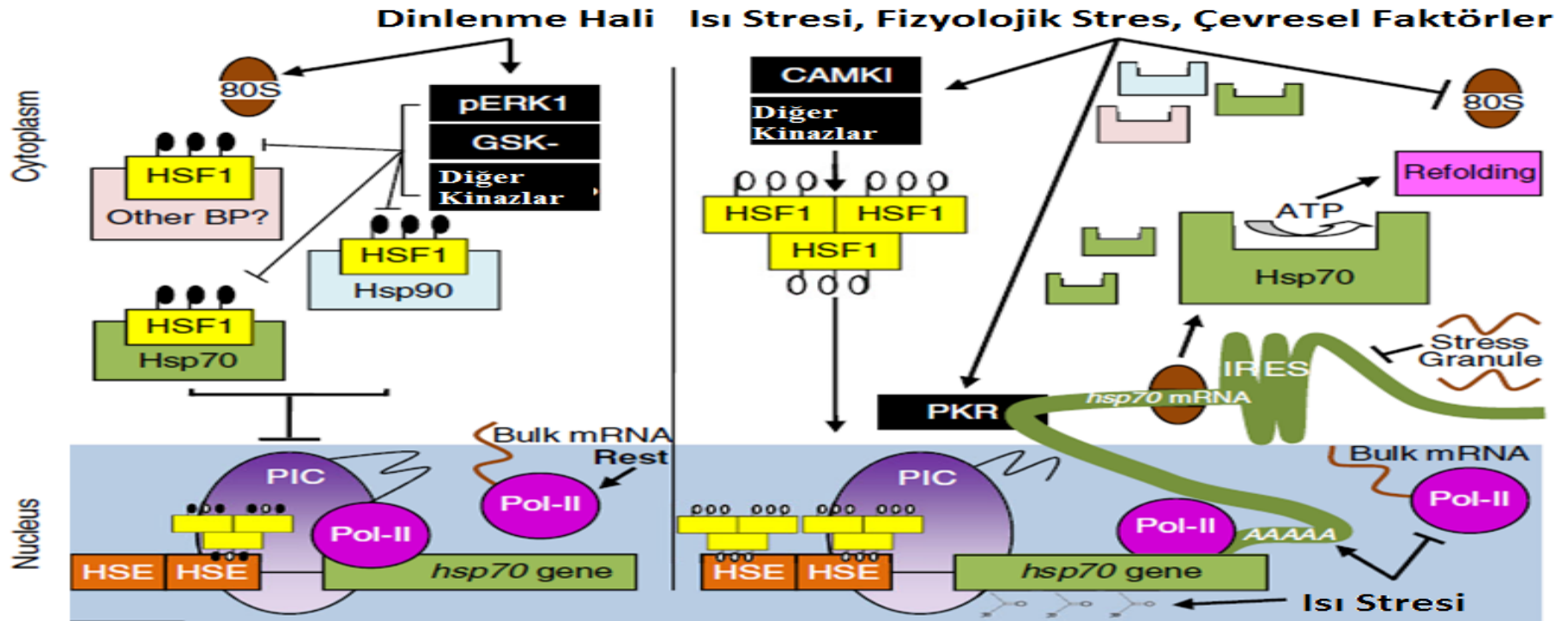
Hsp70 grubundaki proteinler benzer protein sekanslarını paylaşırlar, ancak farklı uyarılara karşı yanıt oluştururlar. Isı şoku (73 kDa'luk) proteini (Hsp73 veya Hsp70) konstitütif olarak sentezlenirken, 72 kDa'luk ısı şoku proteini (Hsp72 veya Hsp70) oldukça indüklenebilirdir ve çok çeşitli stres uyarılarına yanıt olarak sentezi arttırılabilir. Stres uyarılarına arasında enerji azalması, hipoksi, asidozis, iskemi-reperfüzyon, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit gibi reaktif nitrojen türleri ve viral enfeksiyon sayılabilir [104]. Hsc70'in ekspresyonu hücrenin fizyolojik durumuna göre değişim göstermezken, indüklenebilir form olan Hsp70'in ekspresyonu ise hücrede oluşabilecek proteotoksisiteye karşı çok hızlı bir yanıt olarak ani artışlar gösterebilir [105]. Ancak buna zıt olarak, balıklarda yapılan *in vitro* bir deneyde ısı şokunu müteakiben Hsc70 ekspresyon seviyelerinde de bir artış rapor edilmiştir [106]. Isı şoku proteinleri toplamda hücrenin toplam

proteinlerinin ancak %5-10'luk kısmını oluştururken, stres anında bu oran %15-20'lere kadar çıkabilmektedir [105]. İnsan, sıçan ve hamster Hsc70 gen ürünleri %99 benzerlik gösterirken, insan Hsp70 ve Hsc70 amino asit dizileri %85 benzerlik gösterirler. Zebra balığı (*Danio rerio*) Hsc70 izoformları arasındaki benzerlik ise %94'tür. Hsp70 proteininin iki alt domaini vardır. N-terminal domain (44 kDa) ATP bağlama ve hidroliz görevi yaparken, çeşitlilik gösteren C-terminal domaini (30 kDa) katlanmamış polipeptitlerle etkileşim kurmaktadır. Sazan Hsc70-1 ve Hsc70-2 proteinleri, ağır metal stresine karşı yanıt olarak farklı ekspresyon seviyeleri gösterebilirler; bu farklı regüle olduklarına işarettir, ancak iki Hsc70 izoformu arasındaki 69 amino asit değişikliğinden 31'inin 512-642/644 C-terminal segmentinde olması ve bu segmentte 18 kDa'luk peptit bağlama domaini üzerindeki helikal kapağın bulunması, proteinin regülasyonunda rol aldığını düşündürmektedir [107]. Kemirgenlerde Hsp70 geninden Hsp1a1 ve Hsp1b1 olmak üzere iki transkript sentezlenir. Bu iki izoformun açık okuma çerçeveleri çok benzerdir ve insan Hsp70 proteini ile %97 benzerlik gösterirler [108].

Tablo 1.6 Isı şoku Proteinlerinin Hücresel Lokasyonları ve Görevleri [104]

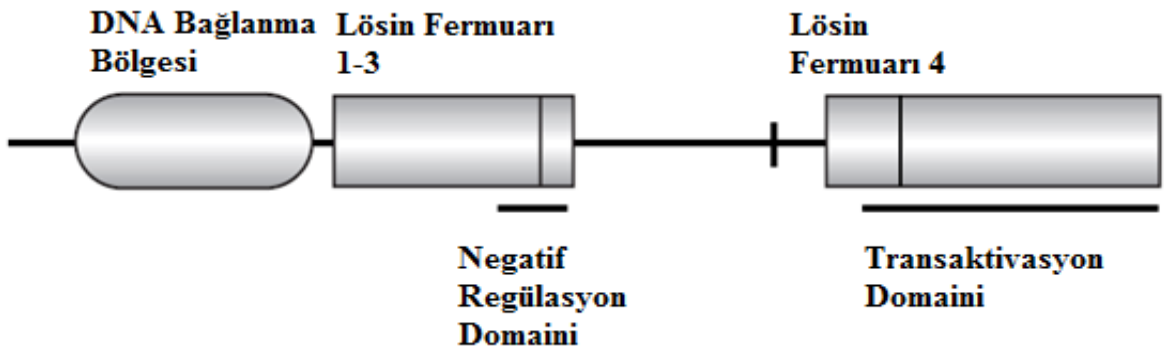
Hsp Ailesi	Hücresel Lokasyon	Önerilen Fonksiyon
Hsp27 (küçük HSP'ler)	Sitozol, çekirdek	Mikrofilament stabilizasyonu, antiapoptotik
Hsp60	Mitokondri	Protein katlanması, agregasyon önlenmesi, proapoptotik
Hsp72 (Hsp70)	Sitozol, çekirdek	Protein katlanması, hücresel koruma
Hsp73 (Hsc70)	Sitozol, çekirdek	Moleküler şaperonlar
Hsp75 (mtHsc70)	Mitokondri	Moleküler şaperonlar
Hsp78 (GRP78)	Endoplazmik retikulum	Hücresel koruma, moleküler şaperonlar
Hsp90	Sitozol, çekirdek, endoplazmik retikulum	Steroid hormon reseptörlerinin regülasyonu, protein translokasyonu
Hsp110/104	Sitozol	Protein katlanması

Isı şoku proteinleri pre-transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel olarak regüle edilebilirler. Pre-transkripsiyonel regülasyonda, ısı stresi ısı şoku faktörü-1'in (HSF1: heat shock factor 1) Hsp70 geninin promotor bölgesinde yerleşmiş ısı şoku elementlerine (HSE: Heat Shock Elements) nükleer translokasyon yoluyla transaktivasyonunu teşvik eder, homotrimerizasyon sağlanır ve Ser230 ile Ser326 serin rezidülerinde fosforilasyon durumu artırılır. Normalde hücrede Hsp70, Hsp90 ile heterokompleks halindedir ve HSF1 monomeri bu komplekse bağlı halde durmaktadır. Isı şoku durumunda Hsp70 bu kompleksten ayrılır ve boş kalan HSF1 monomeri, diğer monomerlerle trimer oluşturarak Hsp70 gen promotorundaki HSE bölgesine bağlanmak üzere nükleusa geçer. Strese ilk yanıt pre-transkripsiyonel regülasyonla uyarılan Hsp70 mRNA sentezidir. Post-transkripsiyonel regülasyonda ise, nükleusta biriken Hsp70 mRNA moleküllerinin nükleus dışına taşınması için özel seçici proteinler görevlidir. Özgün bir mRNP eksport adaptörü olan Thoc5, ısı şokundan sonra biriken Hsp70 mRNA moleküllerini nükleus dışına taşımada çok önemli bir rol oynar. Isı şoku süresince HSF1'in transaktivasyonu ve HSE'nin zapt edilmesi durumu devam eder, böylece Hsp70 mRNA ekspresyonu artarak sürer [108]. Hücre kültürü çalışmalarından alınan sonuçlara göre, stres koşullarında Hsp70'in transkripsiyonel aktivasyonu ve artan Hsp70 mRNA sentezinin Hsp70 proteininin sentezlenmesiyle korelasyon göstermediği ya da çok az miktarda protein seviyesinde artış gözlemlendiği ortaya çıkmıştır. Hsp70 geninin 3' ucunda 242 baz çiftlik translasyona uğramayan bölgenin ısıya tepki gösterdiği ve post-transkripsiyonel regülasyonda rol aldığı öne sürülmüştür [104]. Şekil 1.5'de Hsp70'in regülasyonu özetlenmiştir. Balıkta Hsp genlerinin önemli bir kısmı intron içermez ve bu sayede stres koşulu oluştuğunda ani yanıt oluşur ve ısı şoku proteini mRNA'ları çok hızlı bir şekilde translasyona uğrarlar. HSF1'in amino terminal ucunda 100 kadar amino asitten oluşan DNA bağlanma domaini bulunur ve bu domainin bitişiğinde de HSF1 trimerizasyonunun anahtar noktası kabul edilen üç lösin fermuar tekrarı bulunan bir bölge vardır. DNA bağlanma ve lösin fermuar bölgeleri türler arasında evrimsel olarak oldukça korunmuşlardır. Stres, HSF1 miktarını arttırmaktan ziyade, onun inaktif formunun transkripsiyonel olarak aktif hale dönüşerek Hsp70 ekspresyonuyla sonuçlanmasına neden olur [109]. Şekil 1.6'da HSF1 domainleri ve lösin fermuarları primer protein dizisi üzerinde şematize edilmiştir.



Şekil 1.5 Hsp70 Gen Ekspresyonunun Regülasyonu [108]. Dinlenme halinde hsp70 geni nükleer faktörü HSF1 aktivitesi, hem nükleus hem de sitoplazmada pERK1/2, GSK-3 β ve diğer kinazların konstitütif fosforilasyonu ve Hsp70, Hsp90 ve diğer bağlanma proteinlerinin tecrit edilmesiyle negatif olarak regüle edilir. Bu durumda, HSF1 transaktivasyonel inhibisyonunu sürdürür ve polimeraz-II'nin promotor-duraksamalı durumda kalmasına yol açar. Polimeraz-II pre-inisiasyon kompleksine (PIC) bağlı kalır. Hsp70 mRNA ekspresyonu baskılanmıştır. Strese yanıt olarak, global intron splizing ve cap-bağımlı translasyon (80S) bozulur. HSF1 homotrimerize olur, CAMKII ve diğer kinazlarla fosforilatif duruma geçer. HSE promotoruna bağlanarak transaktivasyonu gerçekleştirir. Aktif HSF1 polimeraz-II'nin PIC kompleksinden ayrılmasını teşvik eder ve hsp70 mRNA transkripsiyon hızında güçlü bir artış olur. Isı şoku hsp70 geninin hiperasetilasyonunu teşvik eder; bu HSF1'in HSE'ye geçmesini artırır. Post-transkripsiyonel fazda, biriken yığın mRNA PKR (protein kinaz R) aracılığıyla stabil kalır. Pre-translasyonel fazda hsp70 mRNA'sı IRES (Internal ribozom giriş yeri) aracılığıyla translasyona uğrar.

Hücresel stres yanıtı ayrıca hücre içinde kalsiyum iyon konsantrasyonunun artmasına ve fosfolipaz C ve A1 gibi enzimlerin teşvik edilmesine neden olur. Bu iki enzim ısı şoku yanıtında hayli önemli ikincil mesajcılardır ve sinyal transdüksiyon kaskadını tetiklerler. Bu işlem HSF1'in fosforilasyonunu etkileyebilir. Bunun yanında MAPK kaskadlarını tetikleyen ısı sensörleri hücre membranında bulunmaktadır ve bu da membrandaki fiziksel değişimlerin ısı şoku yanıtıyla alakalı olduğunu düşündürmektedir [109]. Memeli böbrek hücreleriyle yapılan çalışmalara göre, ATP seviyeleri eşik değer altına düştüğünde, HSF1 trimerizasyonunun tetiklendiği, ancak fibroblast ve böbrek hücrelerinden gelen sonuçlara göre ise HSF1, Hsc70 ve Hsp70'in birlikte daha dinamik ve bağımsız bir rol oynadığı ve Hsc70'in HSF1 aktivasyonunda gerekli olduğu, Hsp70 transkripsiyonunda da bu yolla rol aldığı bildirilmiştir [97]. Hsc70'i hedefleyen siRNA'lar (küçük interferans RNA'lar) ile transfekte edilen memeli hücrelerinde HSF1 aktivasyonunda önemli düzeyde azalma ve HSF1'in hedef genlerinde azalma, Hsc70 ekspresyonunda indirgenme, buna müteakiben de stresle indüklenmiş apoptoz rapor edilmiştir [97], [110]. Bunun yanı sıra, Hsc70 aşırı miktarda ifade olduğunda, ısı şoku olmasa bile HSF1 trimerizasyonunun ve DNA bağlama aktivitesinin indüklendiği bildirilmiştir [110]. Bu sonuçlar Hsc70'in HSF1 aktivitesi için gerekli olduğu ve kritik bir regülatörü vazifesi gördüğünü işaret etmekte, ancak balıkta bu regülasyonun HSF1 aktivasyonunda aldığı rol gelecek çalışmalar için araştırma konusu olabilecektir [97].

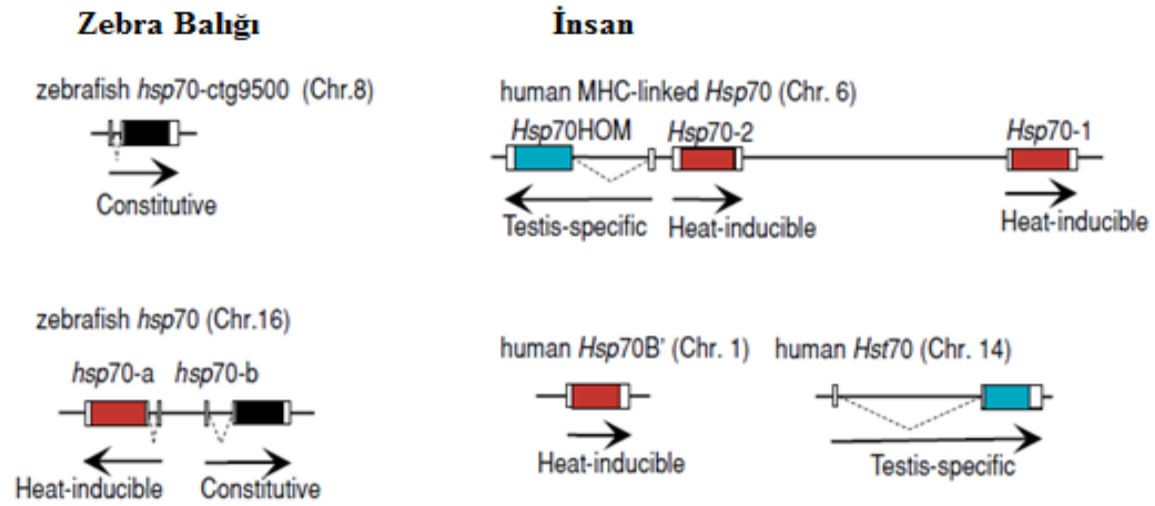


Şekil 1.6 HSF1 Domain ve Lösin Fermuarlarının İnert Monomerik Formda Gösterilmesi [109]. Kalın barlar konstitütif fosforilasyon alanlarını göstermektedir. Lösin fermuarı 1-3 ve 4 bölgeleri monomerik formda ilişki halindedirler, ancak stres koşullarında lösin fermuar 1-3 bölgeleri ile diğer monomerik HSF1 formlarının lösin fermuar 1-3 bölgeleri arasında yeni etkileşimler oluşur ve bu trimerizasyonu sağlar.

Organizmalarda dört olası ısı şoku faktörü vardır. HSF1 memeliler ve evrimsel olarak daha ilkel vertebralarda temel transkripsiyon faktörüdür. HSF4'ün konstitütif olarak ifade edildiği ve HSF2 ifadenmesinin ise gelişimin farklı aşamalarında gözlemlendiği bulunmuştur. Aves'de (Kuşlar) stresle indüklenen temel transkripsiyon faktörü HSF3'tür. Stres yokluğunda ise HSF1 sitoplazmada monomerik bir halde Hsp70'e bağlı olarak bulunur. Stres tespit edildiğinde Hsp70 veya ubiquitin HSF1'den ayrılır ve bu da homotrimerizasyona, ardından da nükleusa transportuna ve kinazlarla hiperfosforilasyonuna yol açar. HSF1'in HSE'ye bağlanmasının regülasyonu ısı şoku bağlanma proteini 1 (Hsbp1) aracılığıyla olur ki; bu protein Hsp70 ile negatif geri beslemeyi ve böylece sentezi baskılama rolünü üstlenebilmektedir [111].

Zebra balığından (*D. rerio*) klonlanan ilk HSF1 zHSF1a olarak, fazladan 78 baz çifti içeren diğer izoformu ise zHSF1b olarak adlandırılmıştır (toplam 2377 baz çifti). zHSF1'de insersiyon kısmından hemen önce lokalize olmuş iki sistein rezidüsü insert dizideki iki histidinle birlikte varsayımsal bir çinko parmak motifi oluşturabilir. Rabergh ve ark.'nın [112] çalışmalarına göre zHSF1b solungaç ve karaciğerde gonadlara nazaran farklı regüle edilmekte ve ısı şokuna yanıtta dokular arasında görülen varyasyon ise bir organizmanın sıcaklık limitlerinin belirli dokularda sağlandığı hipotezini desteklemektedir. Zebra balığında (*D. rerio*) iki farklı zHSF1 olması, alternatif splicing'in hücre ve stres etkenine özgü gen ekspresyonu için bir mekanizma sağlayabileceğine işaret etmektedir [112].

Amino asit homoloji analizi, omurgalı Hsp70 ailesinin ısı ile indüklenebilir üyelerinin geçici olarak altı küme halinde sınıflandırılabilirliğini göstermiştir. Bunlar balık Hsp70'i, memeli testis-spesifik Hst70'i, memeli Hsp70B'si, memeli MHC-bağlantılı Hsp70'i, kuş Hsp70'i ve amfibi Hsp70'i olarak sayılabilir. Moleküler filogeni analizlerine göre, balık Hsp70'i genetik olarak iki farklı gruba, balık Hsp70-1 ve balık Hsp70-2 olarak ayrılabilir. Bu gruba bağlı iki farklı Hsp70 izoformu bulunması, balıklarda evrimsel farklılaşma sırasında ısı indüklü Hsp70 geninin duplikasyona uğradığını düşündürmektedir [113]. Şekil 1.7'de Hsp70 ailesinin filogenetik sınıflandırması ve gen yapıları görülmektedir.



Şekil 1.7 HSP70 Ailesinin Filogenetik Sınıflandırması ve Gen Yapıları [113]. Zebra balığı (*D. rerio*) genomunda üç kopya Hsp70 geni bulunur. Hsp70-a ısı ile indüklenebilen tek Hsp70'dir. Hsp70-a ile Hsp70-b kromozom 16 üzerinde uç uca dizilmişlerdir. Hsp70-ctg9500 ise kromozom 8 üzerinde bulunur. İnsan genomunda beş kopya Hsp70 geni bulunur. Hsp70-1, Hsp70-2 ve Hsp70B' ısı ile indüklenebilir. Hst70 ve Hsp70HOM testis spesifiktir. Oklar bu genlerin ısı ile indüklenebilirliğini göstermektedir.

Balıkta primer, sekonder ve tersiyer stres yanıtı bulunmaktadır. Primer indikatörler nöroendokrin/endokrin yanıtlarla ilişkilidir. Sekonder indikatörler glukoz metabolizmasındaki ve hematolojik parametrelerdeki değişimler gibi metabolik değişimleri kapsamaktadır. Sekonder indikatörler ayrıca Hsp'leri içeren birkaç proteinin ekspresyonunda meydana gelen değişimleri de kapsar. Tersiyer indikatörler nekroz, hücre büyüklüğü ve şeklinde değişiklik, enerji depolama ve sitoplazmik enzim profillerindeki değişiklik ve popülasyon seviyelerinde değişiklik gibi indikatörleri kapsar. Hsp'lerdeki değişimler stres indikatörleridir: Kullanışlı biyobelirteç olarak önemli olduklarını kanıtlamaktadır. Balıklar, doğal çevrelerinde bir dizi stres etkeniyle karşılaştıklarından ve farklı stres etkenlerine maruz kaldıklarından, deneysel olarak Hsp ekspresyonu çalışmak için vazgeçilmez bir model organizma teşkil etmektedirler [97].

Endüstriyel ve diğer aktivitelerle çevreye bırakılan birkaç bin kimyasalın çevre üzerinde doğrudan ve dolaylı etkileri vardır. Bu kimyasalların kimyasal analizlerle biyoyararlanımları değerlendirilebilir. Eğer hedef molekül hücre detoksifikasyonu veya onarımının bir parçası ise, bu biyolojik molekülün gen ekspresyon analizi, kimyasalın biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin belirlenmesi için tahmini bir değer verebilir. Yani stres proteinlerinin indüklenmesi, organizmanın stres

durumunu ve stresin hangi seviyede olduğunu değerlendirilebilmesini sağlar. Sentezlenen Hsp'ler ile stresin seviyesi arasındaki korelasyon, genel stres yanıtı ve toksisite seviyesinin değerlendirilebilmesi için bir indikatör olarak stres genlerinin ekspresyonunun kullanılması fikrini doğurmuştur. Başlangıç olarak Hsp70 sentezinin regülasyonu ısı, amino asit analogu ve ağır metaller gibi sınırlı sayıda güçlü indükleyicilerle çalışılmış olmasına rağmen, son on yılda çevresel risk değerlendirmesi çalışmalarında Hsp70'in kullanılması ivme kazanmıştır. Birçok araştırmacı çevre kirliliğinin bir biyobelirteci olarak Hsp70 ekspresyonunun indüksiyonunu kullanmıştır [100]. Hsp70 seviyelerindeki artışın daha önce polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruziyetle [114], ağır metallere [115] ve pestisitlere [116] maruziyetle korelasyon gösterdiği rapor edilmiştir.

1.5.1.1 Isı Şoku Proteinleri İle Yapılan Ekspresyon Çalışmaları

Sazan balığı (*C. carpio*) ile yapılan bir çalışmada ortam sıcaklığında +14°C'lik bir değişim 3 saat boyunca uygulanmış, Hsc70-1 izoformu transkript seviyeleri karaciğer ve kas dokusunda değişmemiş, bu sıcaklık değişiminin 30. dakikasında Hsp70 transkript seviyelerinde karaciğerde 2,5 kat, kasta ise 1,25 kat artış gözlenmiştir. Aynı çalışmada -7°C'lik bir sıcaklık değişikliği 2 saat boyunca uygulandığında kas dokusunda Hsc70-1 izoformu transkript seviyelerinde %50 azalma bildirilmiştir [107]. Koho somon balığında (*Oncorhynchus kisutch*) çinko maruziyeti ve sıcaklık artışıyla birlikte solungaç ve karaciğer dokularında Hsp70 seviyelerinde azalma gözlenmiş ve bu düşüş, enerji kaynaklarının hücresel protein sentezinden ziyade stres etkenleriyle mücadele için gereken metabolik işlemler yönünde harcanmış olabileceğini düşündürmüştür [117]. Gökkuşacağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) bir poliaromatik hidrokarbon ve aril hidrokarbon reseptörünün agonisti olan β -naftaflavon karaciğer Hsp70 seviyelerinde artışa sebep olmuştur [114]. Juvenil kedi balığı (*Pseudobagrus fulvidraco*) ovaryumlarında β -naftaflavona maruziyet sonucu Hsp70 ekspresyonunda görülen azalma, apoptoz artışı ile korelasyon göstermiştir. AhR agonisti dimetilbenz[a]antrasen ile muamelede benzer etki gözlenmiş ve Hsp70 seviyesindeki azalmanın AhR'nin teşvik edilmesi aracılığıyla olduğu öne sürülmüştür [118]. Ancak ağartılıp öğütülmüş kağıt atığı (BKME) ile muamele edilmiş *Catostomus commersonii* ovaryumlarında Hsp70 seviyeleri ve apoptozda artış gözlenmiştir [119]. Deniz çipura balığı (*Sparus aurata*) karaciğer Hsp70

seviyelerinde ağır metaller ile maruziyette önemli derecede artış gözlenmiştir [120]. Kara kayabalığına (*Gobius niger*) 17 β -östradiol ile maruziyet sonrası karaciğer Hsp70 mRNA transkript seviyelerinde artış rapor edilmiş [121], ancak tatlı su balığı *Poeciliopsis lucida* hepatoma hücre hattında bakır ile muamele sonucunda Hsp60 ve Hsp70 seviyelerinde iki kat artış gözlenirken, 17 β -östradiol ile muamele sonucunda Hsp70 seviyelerinde değişiklik gözlenmemiş ve bakır ve 17 β -östradiol birlikte uygulandığında Hsp70 yanıtında %51 inhibisyon rapor edilmiştir [122]. Memelilerde Hsp90 ve Hsp70, östrojen reseptörünün östrojen bağlamasını kolaylaştıran birer parçası olduğundan, östrojen maruziyeti hücresel Hsp seviyelerini etkileyebilmektedir [123]. Hsp70 geni antisense ile bozulmuş zebra balığı (*D. rerio*) embriolarında küçük göz fenotipi tespit edilmiş, lens bölgesinde apoptoza yönelim gözlenmiş ve Hsp70'in zebra balığı göz gelişiminde anti-apoptotik bir faktör olduğu öne sürülmüştür [124], [125]. Gökkuşluğu alabalığına (*O. mykiss*) ısı şokunun plazma Hsp70 seviyelerine etkisi ise 1. günde 1,6 kat azalma, 4. ve 7. günler arasında ise anlamlı artışlar rapor edilmiştir. 7. gün ısı şoku grubu ile kontrol plazma Hsp70 seviyeleri arasındaki fark anlamsızlaşmıştır [111]. Sazan balığında kadmiyum maruziyetinden 10 saat sonra karaciğer Hsp70 gen ekspresyonunda 15 kat artış gözlenmiş, Hsc70-1 izoformunun ekspresyonunda 96. saatte 13 kat, Hsc70-2 izoformunun ekspresyonunda ise 3 kat artış tespit edilmiştir [107]. Aynı çalışmada kas dokusunda üç genin ekspresyonunda da bir artış bildirilmemiştir. Toprak solucanı (*E. fetida*) yapılan bir çalışmada, yüksek dozda AHTN (6-asetil-1,1,2,4,4,7-hekzametiltetralin) ve HHCB (1,3,4,6,7,8-hekzahidro-4,6,6,7,8,8-hekzametilsiklopenta- γ -2-benzopiren) maruziyetinden 48 saat sonra Hsp70 gen ekspresyonunda önemli seviyede azalma tespit edilmiş; bu azalma oksidatif stresin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir [126]. Buna karşın, atrazin, klorpyrifos gibi temiz su kaynaklarını kirletici pestisitler ile oluşturulan oksidatif stresin ve oksijen radikallerinin erken faz Hsp70 mRNA ekspresyonunu sıçanda kalp, zebra balığında (*D. rerio*) karaciğer ve sazan balığında (*C. carpio*) solungaç, karaciğer ve kalp dokularında indükleyebildiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [127]-[129]. Karagöz balığında (*Mylio macrocephalus*) ise oksidatif stresin Hsc70 gen ekspresyonunu indüklediği, ancak Hsp70 mRNA seviyelerinde bir değişikliğin tespit edilmediği bildirilmiştir [130]. Akut toksisite çalışmalarında Hsp70 mRNA seviyelerinde düzenli değişiklikler görülmemekle birlikte oksidatif stresin Hsp70

ekspresyonunu nasıl etkilediği henüz aydınlatılamamıştır [126]. Sinha ve ark.'nın [131] sazan balığı (*C. carpio*) ile yaptığı bir çalışmada, yüksek amonyak maruziyeti ve açlıkta ortaya çıkan proteotoksisiteye karşı, Hsp70 ekspresyonunda önemli artış bildirilmiş ve bu artışın hücrede biriken denatüre olmuş proteinlerle başa çıkmak ve homeostazi sağlamak için bir stres yanıtı olduğu düşünülmüştür. Ancak gözardı edilmemesi gereken, hücre bir kez normal fonksiyonuna döndüğünde, biriken fazla şaperonlar, Hsp70 için transkripsiyonel regülasyonu inhibisyon yönünde etkileyecektir [103].

Airaksinen ve ark.'nın [132] gökkuşağı alabalığı (*O. mykiss*) hepatositleri ile yaptıkları bir çalışmada ısı şokuna yanıtta Hsp70 indüksiyonunun bir HSF1-benzer proteinin DNA bağlanma aktivitesiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Hipofisektomize edilmiş sıçanlarda zapt edilme stresine rağmen Hsp70 indüksiyonu gözlenmemiş, ancak ACTH (adrenokortikotropik hormon) enjeksiyonunun ardından Hsp70 mRNA seviyelerinde artış tespit edilmiştir [133]. Bu sonuçlar hipotalamus-hipofiz-adrenal ekseninin Hsp70 ekspresyonuyla fonksiyonel ilişkisi olduğu ihtimalini desteklemekte [134] ve *in vitro* çalışmaların yanında *in vivo* çalışmaların da yapılarak stres yanıtının ve etki mekanizmasının canlı organizma sisteminde bütüncül olarak aydınlatılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sung ve ark.'nın sazan balığında yaptığı bir çalışmada, ölümcül amonyak toksisitesine karşı solungaç ve kas dokularında Hsp70 ekspresyonunda artış gözlemlendiği ve bu artış ile hücrel koruma sağlandığı bildirilmiştir [135]. Kontamine edici toksik maddelere maruziyette, Hsp70 ekspresyonunda tespit edilen indüksiyon (veya inhibisyon) ile hücrenin yaşamsal faaliyetlerini sağlayan aktiviteler arasında ters ilişki bulunması, hem hücredeki Hsp70 havuzunun daralması ile indüklenmiş Hsp70 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi, hem de sitotoksik maddelerin tespit edilmesinde Hsp70 ekspresyon seviyelerinin biyobelirteç olarak kullanılması imkanını sunmaktadır [136]–[138].

1.5.2 Çevresel Stres, Oksidatif Stres ve Ksenobiyotik Metabolizması

Canlı organizmalar stresin birçok türüyle karşı karşıyadır. Bu, çevreleriyle etkileşimin doğal bir sonucudur. Sucul veya karasal yaşamda canlı sistemlerinin karşılaştığı abiyotik maddelerin hepsi potansiyel birer stres faktörüdür. Canlıya dışarıdan giren herhangi bir kimyasal ajan, ilaç, pestisit ve hatta diyetle alınan gıda

maddeleri ksenobiyotik olarak adlandırılır ve organizma tarafından metabolize edilmesi sonucunda canlıda mutlaka biyokimyasal değişiklikler meydana getirir. Çevresel olarak indüklenen stres, canlıda genellikle reaktif oksijen türlerinin (ROS) endojen üretimine yol açar. Reaktif oksijen türlerinin çoğu hücre sel solunumun yan ürünleri olarak üretilirler. Sucul canlılar, sanayi atık suları ve iç suların insan yapımı atıkların kontaminasyonu ile oldukça yüksek düzeyde kirliliğe maruz kalırlar. Bu yüzden sucul canlılarda oksidatif stres çalışmaları oldukça fazladır. Stres etmenlerinin canlıdaki etkisi doğrudan reaktif oksijen türlerinin oluşması yönünde olabileceği gibi organizmanın antioksidan potansiyelinin azalması/tükenmesi ya da hücre sel polar moleküllere doğrudan bağlanma şeklinde de olabilir. Oksidatif stres ilk olarak Sies 1985'te tanımlamıştır. Tanıma göre, prooksidan/antioksidan sistemlerde dengenin birincisi yönüne kaymasıyla oluşan duruma "oksidatif stres" denir [139]. Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin bir şekilde, hücre komponentlerine, metabolizmasına ve düzenlenmesine zarar verecek kadar yüksek konsantrasyona ulaşmasıyla olur. Pestisitler, karbohidratlar, metal iyonları ve ağır ilaç dozlamaları, ses, UV radyasyon ve aşırı ısınma, enfeksiyon ve bakteriyel patojenler oksidatif stres oluşturabilmektedir [140]. ROS'a ek olarak, yine endojen olarak üretilen küçük, reaktif sinyal molekülleri olan nitrik oksit gibi reaktif nitrojen türleri (RNS), hidrojen sülfid ve anyonu, karbon monoksit (reaktif karbon türleri), reaktif klorin türleri ve reaktif sülfür türleri gibi moleküller bilinmektedir [141], [142]. Memelilerde endojen reaktif oksijen türlerinin kaynakları olarak NADPH oksidaz ve yedi izoformu, mitokondrial solunum zinciri, endoplazmik retikulumda flavoenzim ERO1, ksantin oksidaz, lipooksijenazlar, siklooksijenazlar, sitokrom P450'ler, flavin-bağımlı demetilaz, poliamin ve amino asit oksidazlar sayılabilir. Serbest bakır veya demir iyonları, hem grupları veya metal depo proteinleri süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) veya hidrojen peroksiti (H_2O_2) hidroksil radikaline (OH^{\cdot}) çevirebilirler. Tablo 1.7'de reaktif oksijen türlerinin kaynakları ve katabolizmalarına aracılık eden biyolojik makromoleküller verilmiştir.

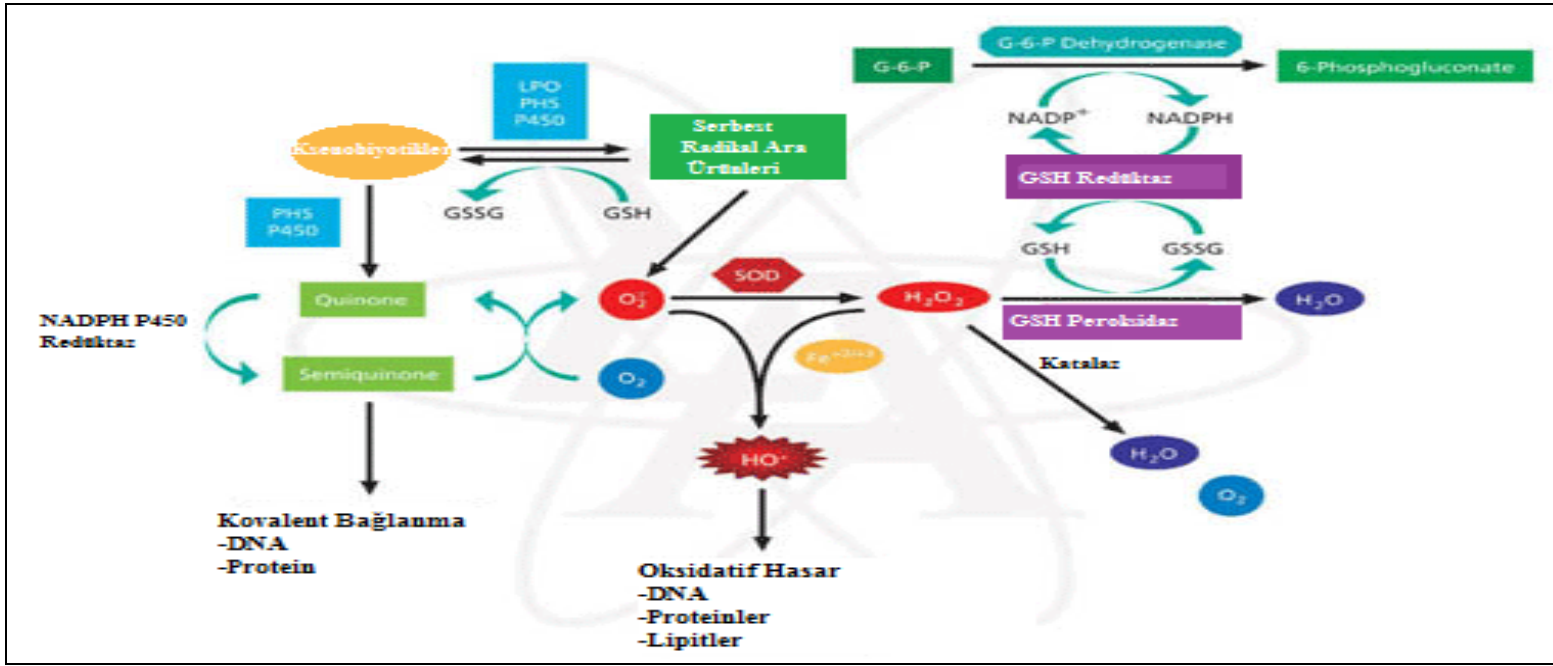
Nitrik oksit sentazlar da, kofaktörleri olan tetrahidrobiopterin veya ko-substratı L-arjinin tükendiğinde reaktif oksijen türleri üretebilirler. L-arjinaz L-arjinini bitirdiğinde, nitrik oksit sentazlar NADPH'dan türetilmiş elektronlarını arjininin guanidino nitrojenleri yerine oksijene bağışlar ve hem süperoksit hem de nitrik oksit (NO^{\cdot}) açığa çıkar. Bu türler ise birbirleriyle reaksiyona girerek peroksinitrit

(OONO⁻), akabinde de güçlü oksidantlardan hidroksil radikali ve nitrojen dioksit radikali (NO₂[•]) oluştururlar. Bu radikaller, redoksa duyarlı sisteinleri peroksitlere göre 100 kat hızlı oksitleyebilirler [141].

Tablo 1.7 Reaktif Oksijen Türleri Kaynakları ve Katabolizmaları [141]

Ekzojen ROS Kaynakları	Endojen ROS Kaynakları	Katabolik Antioksidan Moleküller
Sigara	NADPH oksidazlar	Süperoksit dismutaz
Hava kirleticileri UV radyasyon	Mitokondri ER flavoenzim ERO1	Katalaz Glutasyon peroksidaz
γ-irradiasyon	Ksantin oksidaz	Glutasyon redüktaz
İlaçlar, kimyasallar, ksenobiyotikler	Lipooksijenazlar Siklooksijenazlar Sitokrom P450 enzimleri Flavin-bağımlı demetilaz Poliamin ve amino asit oksidazlar Nitrik oksit sentazlar Serbest demir ve bakır iyonları Hem grupları Metal depolayıcı proteinleri	Tiyoredoksinler Tiyoredoksin redüktaz Metiyonin sülfoksit redüktaz Peroksiredoksinler veya peroksinitrit redüktaz

Yakın geçmişe kadar antioksidan sistemlerin süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon redoks döngüsü enzimlerinden ibaret olduğu sanılıyordu, ancak bugün bunlara ek olarak, tiyoredoksin peroksidaz (peroksiredoksin) [143], [144], tiyoredoksin redüktaz ve metiyonin sülfoksit redüktaz enzimleri de bilinmektedir [141], [145]. Bunun yanında süperoksit dismutaz, katalaz, glutasyon redüktaz, glutasyon-S-transferaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri günümüzde halen en güvenilir ve vazgeçilmez oksidatif stres biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadırlar [146]–[148]. Metabolik detoksifikasyon için belirlenen kompleks enzimatik yollar Şekil 1.8’de görülmektedir.



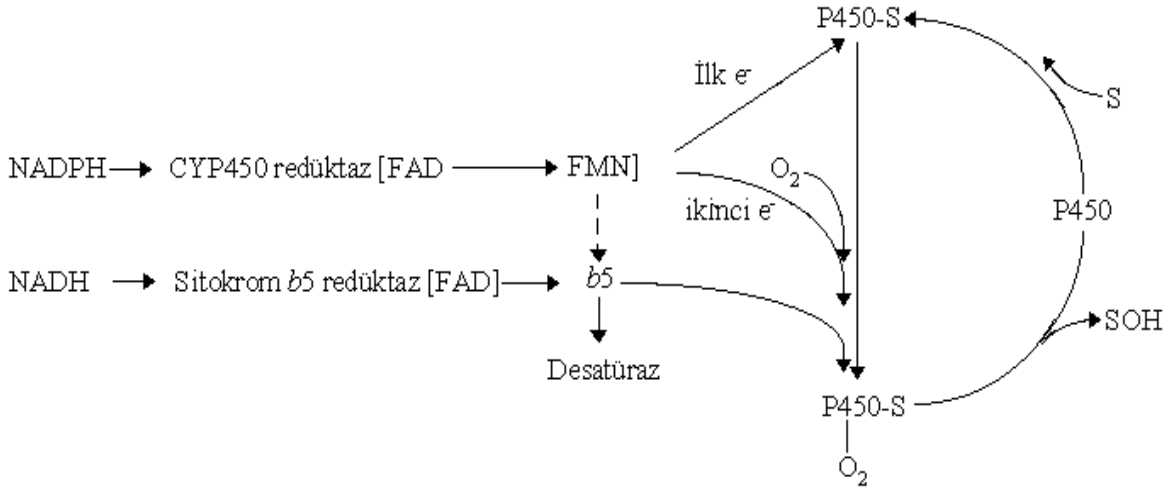
Şekil 1.8 Metabolik Detoksifikasyon ve Reaktif Oksijen Türlerinin Üretilmesi [149]. Antioksidant metabolizma 3 fazda incelenir. Faz I reaksiyonları (transformasyon) lipid peroksidasyonları, aromatik hidroksilasyon, alifatik hidroksilasyon, dehalojenasyon reaksiyonlarının, sitokrom P450ler gibi oksidazlar ve oksijenazlarla veya dehidrogenazlarla gerçekleştiği ve ksenobiyotiklerin ya da endobiyotiklerin, yağda çözünen bileşiklerin daha polar, suda çözünür ara bileşiklere dönüştürüldüğü ilk basamaktır. Burada oluşan süperoksitler, epoksitler, hidroksilli bileşikler gibi ara bileşikler faz II reaksiyonlarının (konjugasyon) substratıdır. Faz I'de oluşan ara bileşikler hemen atılabilecek kadar polar ya da zararsız bileşikler olmadığından Faz II reaksiyonlarında konjuge moleküllere dönüştürülürler. Faz II enzimleri süperoksit dismutaz, UDP-glukuronil transferaz, glutatyon-S-transferaz, sulfotransferaz, metil transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, kuinon oksidoredüktaz gibi enzimatik konjugasyon fonksiyonlu biyomoleküllerdir. Nükleik asitler, proteinler gibi hedefleri olan reaktif oksijen türlerinin daha polar, zararsız, suda çözünen ve atılmaya hazır bileşikler haline dönüştürülmesi organizma için hayati önem taşır. Faz III metabolizması ise dönüştürülen konjuge toksinlerin hücre dışına atılmasından sorumludur.

1.5.2.1 Sitokrom P450: Oksidatif Stres ve Kirlilik Biyobelirteci Olarak CYP1A

Sitokrom P450 monooksijenaz -substratına iki oksijen atomundan yalnızca biri katıldığı için monooksijenasyon reaksiyonu denir- enzim sistemi ksenobiyotik ve endobiyotiklerin, prostaglandinlerin, lökotrienlerin metabolizmasında faz I reaksiyonlarında görevli en önemli enzim ailesidir. Bunlar "hem" grubu içeren proteinlerdir ve birincil olarak karaciğerde, bunun yanında barsak lümeninde, akciğerlerde, böbreklerde ve beyinde bulunurlar. Hücre içinde düz endoplazmik retikulumda (SER) ve mitokondri iç membranında lokalize olmuşlardır. "450" rakamı; "hem" içeren karaciğer pigmentlerinin, karbon monoksit bağlandıktan sonra absorbe ettiği ışığın dalga boyunun nanometre olarak en yüksek değerini ifade eder [150]. P450 enzimleri hidroksilasyon, N-, O-, S-dealkilasyon, deaminasyon, oksijenasyon, epoksidasyon, desülfürasyon, dehalojenasyon, N-oksit redüksiyon ve sülfoksidasyon gibi birçok farklı tepkimeyi katalize ederler [151]. Metabolize edilen lipofilik maddeler, daha polar hidrofilik bileşiklere dönüşür ve bu şekilde vücuttan atılmaları olanaklı hale gelir. Metabolitler sıklıkla ana molekülden daha az aktiftirler, ancak aktif de olabilirler. Metabolitlerin toksik, karsinojen veya teratojen olmaları da mümkündür. Metaboliti karsinojen olan bir maddeyi metabolize eden enzimin indüksiyonu doğal olarak karsinojen etki yapacaktır [152]. Ksenobiyotiklerin sitokrom P450-aracılı metabolizmasının amacı, onları vücuttan atmak olmasına rağmen, paradoksal olarak bu metabolizma ayrıca yüksek düzeyde reaktif elektrofilik metabolitler de üretebilir. P450 enzim sisteminin substratına karşı seçiciliği çok azdır [153]. Böylece vücuda giren herhangi bir ksenobiyotiği detoksifiye edebilir, ancak bu özellik enzimatik reaksiyonun hızıyla ters orantılıdır [154]. Bu metabolitler çok önemli hücresel bileşenlerle, hücre ölümüne yol açabilen, toksisitenin yükselmesini sağlayan kovalent etkileşimler yapabilir ya da, takiben DNA ile etkileşen, tümör gelişmesini ilerleten mutasyonları indükleyebilir. Alternatif olarak, bu reaktif metabolitler moleküler oksijenle etkileşime girerek hücreyi zor duruma iten reaktif oksijen türleri üretebilirler.

2000'li yıllara kadar evrensel olarak iki tip P450 enzim sisteminin var olduğu sanılıyordu. Bakteriyel ve mitokondriyel olanlar tip I, mikrozomal olanlar ise tip II diye adlandırıldılar. Tip I P450 sistemi üç bileşenliydi. Bunlar FAD (flavin adenin dinükleotit) içeren bir flavoprotein (NADPH veya NADH redüktaz), demir-sülfürlü protein ve P450 idi. Tip II ise iki bileşenliydi ve bunlar ise FAD ve FMN (flavin

mononükleotit) bir flavoprotein olan NADPH:P450 redüktaz ve P450 idi [151]. Ancak yeni bilgiler ışığında P450 sistemleri artık on başlık altında incelenmekte ve romen rakamlarıyla adlandırılmaktadırlar [155]. Yeni bulunan bazı P450 monooksijenazlarda, moleküler oksijenin redüktif aktivasyonu için elektron transfer zincirinden redoks eşlenik kaynağı olarak başka redoks partneri protein bileşenine ihtiyaç duyulmamaktadır. Çoğu P450 sistemi ise NAD(P)H gibi bir elektron donöründen transfer edilen elektronla oksijeni redüktif parçalayıp substratı bir oksijen atomu ile birleştirir. Bu klasik P450 reaksiyonu Şekil 1.9'da gösterilmiştir. P450 sisteminde prostetik grup demir protoporfirindir ve hem grubu iki farklı spin durumunda bulunur. Bunlar düşük (hekza) ve yüksek (penta) spinli durumlardır ve demir atomunu çeviren elektronik kalkanlar olarak tanımlanırlar. P450 molekülü substrata bağlanınca kalkanda meydana gelen irritasyon demirin hekzadan pentaya geçişini sağlar. Substrata bağlı penta koordinasyonu (-170 milivolt), substrata bağlanamayan hekza durumuna göre (-270 milivolt) daha pozitif ve oksidan olduğundan NADPH'dan gelen elektronlarla indirgenebilir. Hem demiri Fe^{+3} 'den Fe^{+2} 'ye indirgendiğinde oksijen hem demirine bağlanır ve iki elektron teker teker transfer edilir. Oksijen bağlandıktan sonra sisteme substrat girer ve reaktif oksijen türleri oluşarak sistemden ayrılırlar [151].



Şekil 1.9 Sitokrom P450'nin Katalizlediği Temel Hidroksilasyon Reaksiyonu [151]

Sınıf I ve Sınıf II P450 sistemleri klasik sistemlerdir. Sınıf I'in bakteri versiyonunda tüm proteinler suda çözünürdür, fakat ökaryotlardaki versiyonunda yalnızca ferredoksin mitokondri matriksinin çözünür bir proteindir ve redüktaz ile sitokrom P450 mitokondri iç membranına bağlıdırlar. Elektron donörü NADH, ferredoksin ise $[2Fe-2S]$ tipidir [156]. Sınıf II P450 sistemi hem endojen hem ekzojen

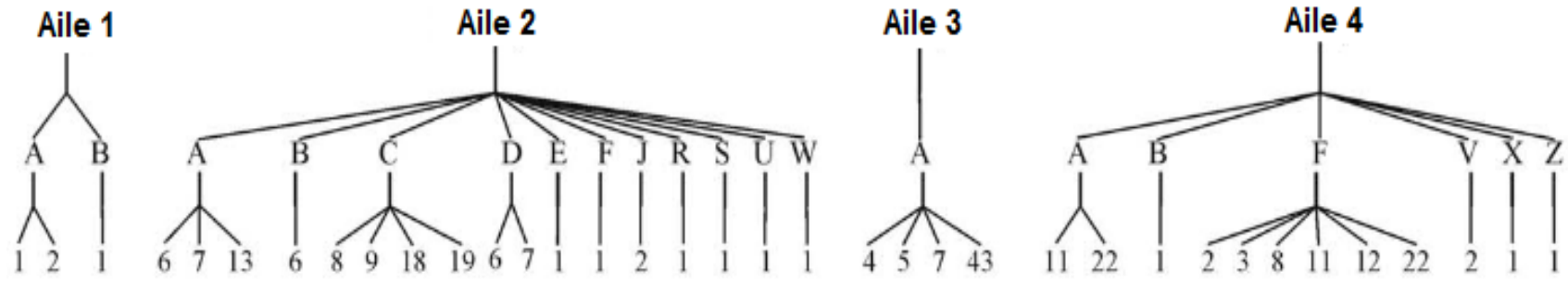
bileşiklerin oksidatif metabolizmasından sorumludur ve ökaryotlardaki genel P450 sistemidir. Sınıf II P450 sistemi ökaryot endoplazmik retikulumuna yerleşmiştir ve iki integral membran proteininden oluşur: sitokrom P450 ve prostetik grubu FAD ve FMN olan P450 redüktaz. Sınıf II prokaryotlarda yalnızca *Streptomyces carbophilus*'da bulunur ve CYP105A3 ile P450 redüktazdan oluşur [157]. Sınıf III ise üç bileşenli yeni bir bakteriyel P450 sistemidir. Bu sistemde elektronlar klasik sınıf I sisteminde olduğu gibi FAD ve demir-sülfür takımı ile değil, FAD ve FMN redoks merkezleri aracılığıyla transfer edilir. Sınıf IV sistemi termofiliktir, ısıya ve basınca dayanıklıdır. İndirgeyici eşleniklerini NADPH bağımlı bir flavoproteinden elde etmeyen CYP119 bu sistem için karakteristiktir [157]. Sınıf V yeni keşfedilen bir sistemdir ve NADPH bağımlı redüktaz ile P450-ferredoksin füzyon proteininden oluşur. Sınıf VI sisteminin sınıf V'den farkı flavodoksin-P450 füzyon proteinidir. Sınıf VIII sisteminde diğerlerinden farklı olarak P450 redüktaz ile diflavin redüktaz partneri aynı polipeptit zincirinde bulunur ve katalitik olarak kendi kendine yeterlidir. Sınıf IX mitokondriyal ve sitozolik fraksiyonlarda bulunur ve aslında bir nitrik oksit redüktazdır. Sınıf X ise allen oksit sentaz, yağ asidi hidroperoksit liyaz, divinil eter sentaz, prostasiklin sentaz ve tromboksan sentazı kapsar. NADPH ve redüktazdan bağımsızdır. Oksijen molekülüne ihtiyaç duymaz ve substratın açıl hidroperoksidini oksijen donörü olarak kullanır [157]. Tablo 1.8'de P450 sistemlerinin elektron transferinden sorumlu protein bileşenlerinin topolojisine göre sınıflandırılması verilmiştir.

Sitokrom P450 ailesi birçok alt aileden oluşur. Alt aileler filogenetik olarak birbirleriyle akraba değildir ve CYP1A1, 1A2, 2E1, 7A1, 11A1, 11B1, 17A1, 19A1, 21A1 gibi farklı gen gruplarından oluşmuşlardır. Memelilerdeki CYP1A1 ve 1A2, sıçanlardaki CYP2D demeti gibi bazı P450 gen demetlerinin duplikasyonu ile ortaya çıkmışlardır [151]. Bazı sitokrom P450 izoformları yalnızca belli organlarda lokalize olmuşlardır. CYP4B1 akciğerde, CYP2S1 akciğer ve barsakta, CYP2U1 beyin ve timusta bulunur [158]–[160]. Sitokrom P450 aileleri Şekil 1.10'da gösterilmiştir. CYP1, 2 ve 3 aileleri ksenobiyotik metabolizmasında görev alan en önemli ailelerdir ve substratları olan alkol, benzopiren ve diğer karsinojenitesi yüksek aromatik hidrokarbonlu bileşiklerle oldukça yüksek düzeyde indüklenebilirler [161], [162].

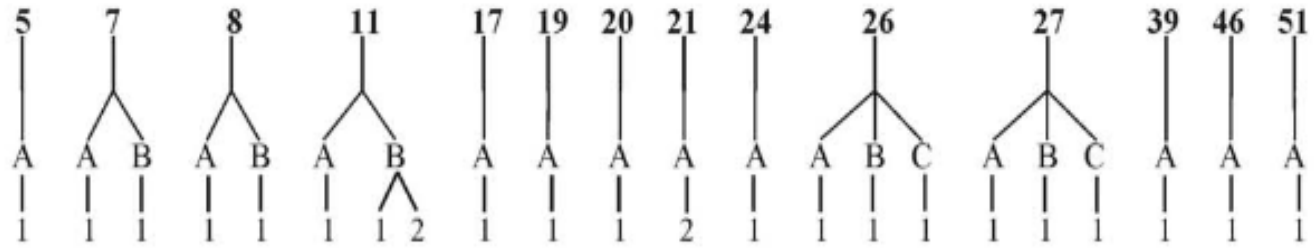
Tablo 1.8 Elektron Transferinde Görevli Protein Bileşenlerinin Topolojisine Göre P450 Sistemleri [157]

	Sınıf/Kaynak	Elektron Transport Zinciri	Lokalizasyon/Özellik
Sınıf I	Bakteriyel	NAD(P)H>[FdR]>[Fdx] ^a >[P450]	Sitozolik, çözünür
	Mitokondriyel	NADPH>[FdR]>[Fdx]>[P450]	P450: iç mitokondri membranı FdR: membranla ilişkili Fdx: mitokondri matriksi, çözünür
Sınıf II	Bakteriyel	NADH>[CPR]>[P450]	Sitozolik, çözünür
	Mikrozomal A	NADPH>[CPR]>[P450]	Membrana bağlı, ER
	Mikrozomal B	NADPH>[CPR]>[cytb5]>[P450]	Membrana bağlı, ER
	Mikrozomal C	NADH>[cytb5Red]>[cytb5]>[P450]	Membrana bağlı, ER
Sınıf III	Bakteriyel	NAD(P)H>[FdR]>[Fldx]>[P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf IV	Bakteriyel	Pirüvat, CoA>[OFOR]>[Fdx]>[P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf V	Bakteriyel	NADH>[FdR]>[Fdx-P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf VI	Bakteriyel	NAD(P)H>[FdR]>[Fldx-P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf VII	Bakteriyel	NADH>[PFOR-P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf VIII	Bakteri, fungi	NADPH>[CPR-P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf IX	Sadece NADH bağımlı, fungi	NADH>[P450]	Sitozolik, çözünür
Sınıf X	Bitki ve memelilerde, bağımsız	[P450]	Membrana bağlı, ER

Fdx: Demir-sülfür redoks merkezi; FdR: Ferredoksin redüktaz; CPR: sitokrom P450 redüktaz; Fldx: Flavodoksin; OFOR: 2-oksoasit:ferredoksin oksidoredüktaz; PFOR: fitalat ailesi oksijenaz redüktaz; ^a: Fdx içeren demir-sülfür takımı



Diğer Aileler



Şekil 1.10 Sitokrom P450 Ailelerinin Filogenetik Sınıflandırması [163]

Sigara dumanında bulunan benzen, nitrozaminler, 1,3-bütadien gibi prokarsinojen maddeler sitokrom P450 izoformlarından CYP2E1 ile aktive edilirler ve karsinojenik etkilerini oluşturan toksik ürünler yoluyla gösterirler. Aktive edilmiş benzen nükleik asitlere doğrudan bağlanabilir. N-nitrozodimetilamin ise alkolle indüklenebilen faz I enzimlerinden CYP2E1 metabolizmasıyla alfa karbonu hidroksillenmiş metilleyici ajanlara dönüştürülürler [164]. Karaciğerde ilaç metabolizmasında rol alan başlıca sitokrom P450 izoformları ise CYP3A1, CYP3A4, CYP2E1, CYP2D1-2 ve CYP2C6'dır [165]. Tablo 1.9'da başlıca sitokrom P450 ailelerinin özellikleri verilmiştir.

Tablo 1.9 Sık Çalışılan P450 Alt Ailelerinin Özellikleri [151], [166]–[168]

<i>Enzim</i>	<i>Substratı</i>	<i>İndükleyicileri</i>	<i>İnhibitörleri</i>
CYP1A	Asetaminofen, teofilin, kafein, fenasetin, trikarboksilik asit demetilasyon	Sigara dumanı, kızartılmış yiyecekler, omeprazol	Siprofloksasin, enoksasin, norfloksasin, fluvoksamin
CYP2C	Dapson, diazepam, warfarin, tolbutamid, fenitoin	Deksametazon, fenobarbital	Amiodaron, simetidin, sertralin
CYP2D	Beta blokörler, debrisoquin, omeprazol, dekstrometorfan, trisiklik antidepresanlar (mirtazapin)	Trisiklik antidepresanlar (mirtazapin)	Klomipramin, desipramin, fluoksetin, paroksetin, sertralin, tioridazin
CYP2E	Asetaminofen, etanol	Etanol, izoniazid	Disülfiram
CYP3A	Sisaprid, kortikosteroidler, siklosporin, dapson, dekstrometorfan, diazepam, ketokonazol, midazolam, warfarin, triazolam, teofilin	Karbamazepin, glukokortikoidler, fenobarbital, fenitoin, rifampin	Simetidin, itrakonazol, ketokonazol, makrolidler, nifedipin, verapamil, sertralin, fluoksetin

Sitokrom P450 sistemi bakteri, fungi, bitki, balık, kuş, sürüngen, böcek ve memelileri de içine alan çoğu organizma türünde karakterize edilmiştir [163].

CYP1A alt ailesi en iyi karakterize edilmiş P450 ailesi olmakla birlikte, poliaromatik hidrokarbonlar (PAH) ve polisiklik arilaminler gibi çeşitli ekzojen indükleyicilere verdikleri tepkiler çok çalışılmıştır. Bunun en belirgin nedeni, karsinojenlerin ve diğer toksik kimyasalların metabolizmasında ve aktivasyonunda rol almalarıdır. CYP1A alt ailesi iki genden oluşur. Bunlar CYP1A1 ve CYP1A2'dir ve bütün memelilerde bulunmaktadır. Bu iki CYP1A alt ailesi %75 amino asit homolojisi paylaşmakta ve ortak indükleyicileri bulunmaktaysa da, transkripsiyonel regülasyonlarında farklılıklar bilinmektedir. CYP1A1 sadece karaciğerde değil, aynı zamanda akciğer, deri ve böbreklerde de indüklenmekte, ancak CYP1A2 yalnızca karaciğerde indüklenmektedir. Bunun yanında, izosafrol CYP1A2'nin indükleyicisi olmasına rağmen CYP1A1'i indüklememektedir [169].

CYP1A2 kuşlar ve memelilerde bulunmasına rağmen balıklarda bulunmaz [170]. CYP1A2'nin bir duplikasyonla 380 ile 320 milyon yıl önce CYP1A1'den evrimleştiği düşünülmektedir. Diyet bileşenleri ve çevresel kimyasalların metabolizmasında hayati veya üremeye yönelik bir avantaj sağlamış olabileceği bildirilmiştir [170], [171]. CYP1A enzimi substratlarıyla indüklenebilir. Bunlar lipofilik düzlemsel moleküller ve halkasal bileşiklerdir. CYP1A izoformlarının metabolik olarak aktive ettiği karsinojenler DNA'ya yüksek derecede bağlanırlar [172]. CYP1A ekspresyonunun regülasyonu ksenobiyotik yanıt elementince (XRE) sağlanır. XRE indükleyicilerinin varlığında CYP1A sentezi artırılır. Diğer regülatör element temel transkripsiyon elementi (BTE) olarak temel gen ekspresyonunda görevlidir. Sitoplazmik aril hidrokarbon reseptörüne (AhR), ligandı olan poliaromatik hidrokarbon bileşikleri bağlandığında XRE çalışır. Ksenobiyotikler bu kaskad ile CYP1A mRNA sentezini artırır ve protein seviyeleri yükselir [173]. Bu indüklenme, söz konusu kirleticilerin hassas, doz bağımlı, tersinir ve özgün biyobelirteçleri olarak kullanılabilir ve bazı yüksek seviyede toksik etkilerin önceden tahmin edilebilmesine olanak sağlayabilir.

Çevresel kirletici 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) CYP1A'nın prototip indükleyicisidir ve indüksiyon mekanizması çalışmalarında yaygın olarak kullanılır. Ancak AhR'nin dimerizasyon partneri AhR nükleer translokatorü (Arnt) TCDD maruziyetine karşı tepkisizdir. AhR ve Arnt temel-heliks-loop-heliks (bHLH) ve Per-Arnt-Sim (PAS) domainlerini de kapsayan transkripsiyon faktörleri ailesindedirler [174]. Ligand varlığında AhR-Arnt heterodimeri oluşur ve CYP1A geninin

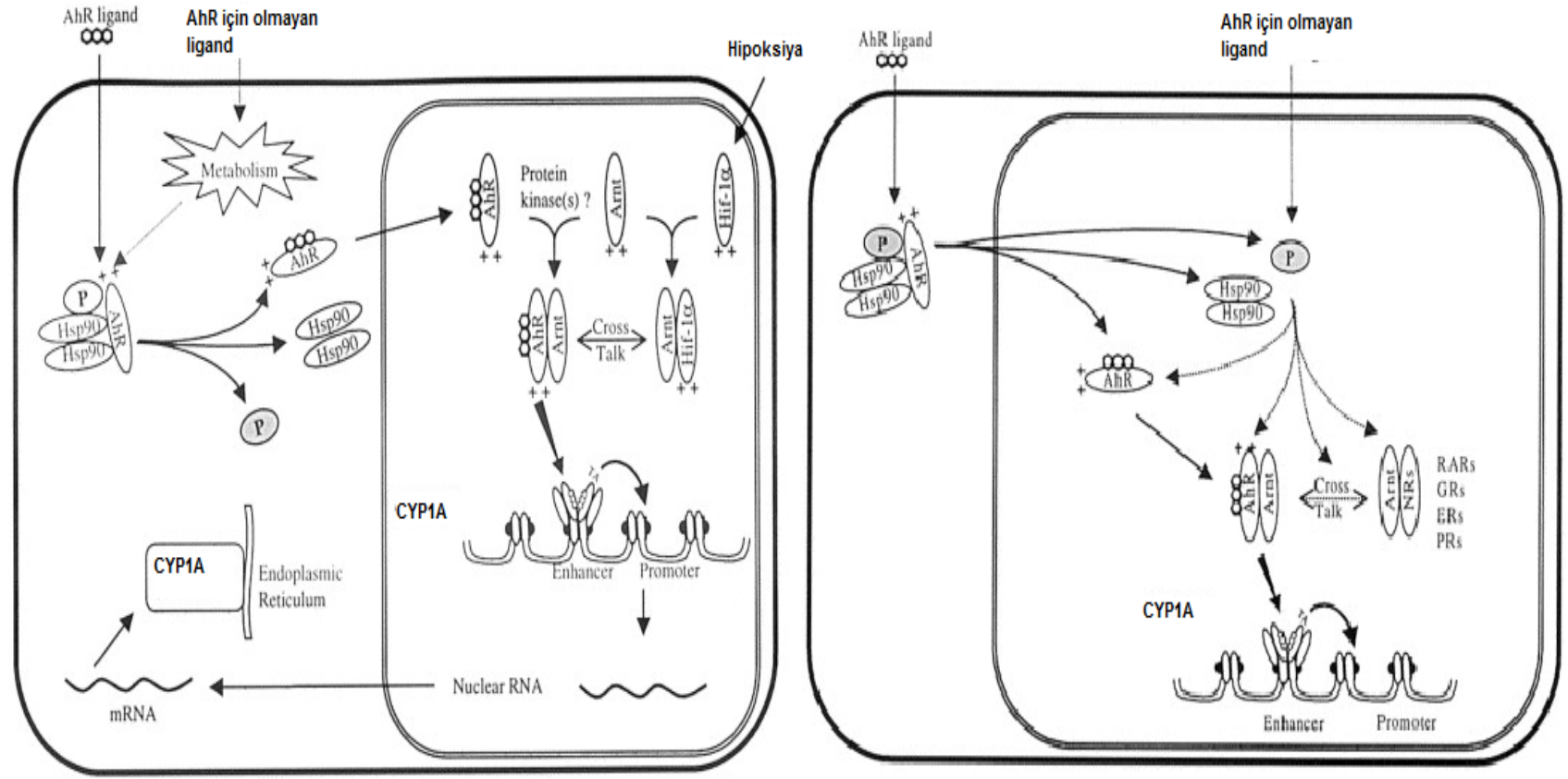
proksimal ve distal promotor bölgelerindeki TNGCGTG gibi ksenobiyotik yanıt elementlerine bağlanır. AhR sinyallemesi yalnızca CYP1A izoformunu değil, UDP-glukuronoziltransferaz 1A, NAD(P)H:kuinon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz A2 gibi diğer bazı stres enzimlerini de indükleyebilir [175]. AhR geni bakımından knock-out farelerde AhR prototipik agonistlerinin varlığında CYP1A indüksiyonu gözlenmemiştir. CYP1A indüksiyonunun derecesinde tespit edilen varyasyon AhR ve Arnt polimorfizmine bağlı olabilir [173].

CYP1A indüksiyonuna ilişkin çalışmalarda, AhR ve CYP1A indüksiyonu arasındaki ilişkinin sanılandan daha karmaşık olduğu sonucuna varılmıştır. Gökkuşığı alabalığı hepatositlerinde yapılan bir çalışmada, β -östradiol ile maruziyet sonrasında CYP1A transkripsiyonunda ve EROD aktivitesinde azalma tespit edilmiş, ancak östrojen reseptörü (ER) antagonisti olan tamoksifen ve CYP1A indükleyicisi β -naftaflavon varlığında ER'nin CYP1A üzerindeki inhibisyon etkisi ortadan kalkmıştır [176]. Aktive edilmiş AhR-ligand kompleksinin E2-ER kompleksini modüle ettiği ve östrojen yanıt elementlerinin (XRE) transkripsiyonel regülasyonu aracılığıyla veya ortak kofaktörler için yarışma sonucu aktif ER'nin DNA bağlanma kapasitesinde azalma olduğu bilinmektedir [177]. Bu mekanizmanın çift yönlü çalışarak, ligandla aktive edilmiş ER'nin AhR'nin gen transkripsiyonundaki aksiyonunu baskılayabileceği bir çapraz-etki olasılığından söz edilmektedir [176]. AhR-agonist aracılı anti-östrojenik etkinin nükleer AhR-Arnt kompleksinin ER α 'yı AhR-yanıtı aracılı gen promotorlarına yönlendirdiği ve böylece östrojen yanıtı genlerinin transkripsiyonunun engellendiği öne sürülmüş ve bunun da proteozom kompleksinin çalıştırılmasıyla koordine yürütüldüğü, ubikuitinasyon ve reseptörlerin degradasyonu ile sonuçlandığı düşünülmüştür [178], [179]. Bunun yanında, ER agonistlerinin yokluğunda, ligandla aktive edilmiş AhR aracılığıyla ER'in gasp edilmesi, diğer bir deyişle AhR-Arnt kompleksinin ER'a bağlanıp DNA üzerindeki östrojen yanıt elementlerine (ERE) bağlanması için görevlendirmesi ile östrojen yanıtının oluştuğu rapor edilmiştir [180].

AhR aracılıklı CYP1A indüksiyonu modeline ek olarak, AhR antanogisti olan α -naftaflavon varlığında, omeprazol, karbaril ve primakuine-bağımlı CYP1A indüksiyonunda bir baskılanma gözlenmemiş ve AhR-Arnt modeli dışında başka sinyal yollarıyla da CYP1A indüksiyonunun sağlanabileceği öne sürülmüştür [181]. Bunun yanında, sinyal transdüksiyonu için AhR ve Arnt'nin treonin rezidüleri

üzerinden bir serin/treonin protein kinaz C (PKC) ile fosforillenmesi gerektiği ortaya çıkmıştır [182]. Bu doğrultuda protein kinazların CYP1A indüksiyonunun regülasyonunda modülatör etkisi olduğu düşünülebilir. Staurosporin gibi PKC inhibitörleri varlığında, CYP1A'nın evrensel indükleyicisi 3-MC-bağımlı transkripsiyonel indüksiyonunun baskılandığı bildirilmiştir. Buna karşın, PKC aktivatörü 12-O-tetradekanoil forbol 13-asetat varlığında CYP1A ekspresyonunun arttığı ve hatta aktivatör muamelesinden sonra 3-MC ile dozlamının 9. ve 14. saatlerinde CYP1A indüksiyonunun iki katına çıktığı gözlenmiştir [181]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, NF-kappaB alt ünitesi RelB'nin AhR ile fonksiyonel ilişkisi olduğunu ve hızlı stres yanıtında AhR/RelB ve protein kinazın birlikte görev yaptıkları ortaya konmuştur. AhR/RelB kompleksinin ksenobiyotik yanıt elementlerine bağlandığı ve CYP1A indükleyicisi TCDD varlığında RelB transkripsiyonunun da arttığı rapor edilmiştir [183]. TCDD'nin MAPK'yı (mitojen-aktifli protein kinaz) teşvik ettiği ve MAPK'nın AhR-bağımlı gen transkripsiyonu ve CYP1A ekspresyonu için kritik olduğu bilinmektedir. Bu da AhR ligandlarının, AhR aktivasyonu ve fonksiyonunda genomik olmayan ve AhR'den bağımsız önemli aktiviteler gösterdiğine işâret etmektedir [184]. AhR heterodimerizasyonundaki yüksek varyasyon, birbirinden bağımsız metabolik olaylardaki rolü ve kompleks sinyal yolağı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Şekil 1.11'de AhR sinyal yolu için önerilen model ve alternatif model gösterilmiştir.

Somon balığı (*Salmo salar*) hepatositleriyle yapılan bir çalışmada, östrojenin taklidi olan nonilfenol ile muamelede, PCB-77 ile indüklenmiş AhR α , AhR β , AhRR (AhR represörü), Arnt, CYP1A1 ve UDPGT transkripsiyon seviyelerinde azalma tespit edilmiş ve nonilfenol gibi östrojen taklitlerinin indüklenmiş AhR sinyallenmesini bastırdığı rapor edilmiştir [185]. Mortensen ve ark.'nın [186] yaptığı başka bir çalışmada ise gökkuşacağı alabalığı (*O. mykiss*) primer hepatosit hücrelerinde nonilfenol muamelesiyle ER α , ER β , vitellogenin ve zona radiata mRNA ekspresyonunda önemli seviyede yükselme görülürken, bu etki nonilfenol PCB-77 ile birlikte muamelede inhibe olmuştur. PCB-77 tek başına dozlandığında CYP1A mRNA seviyesinde görülen ani artış, nonilfenolle kombine PCB-77 maruziyetinde önemli derecede azalmıştır.



Şekil 1.11 AhR Sinyal Yolu ve CYP1A'nın İndüklenmesi İçin Önerilen İki Model [181]. Soldaki model klasik AhR-Arnt kompleksini anlatmaktadır. AhR ligandı ya da AhR ligandı olmayan bir maddenin metabolitinin AhR ile dimerize olması ve nükleusa giderek AhR-Arnt kompleks heterodimerini oluşturup, CYP1A için XRE elementine bağlanması sonucu CYP1A mRNA transkripsiyonu gösterilmiştir. Sağdaki model ise yeni bulgular ışığında çizilmiş alternatif modeldir ve protein kinaz, fosforlanma ve AhR-Arnt heterodimerinin östrojen reseptörü gibi moleküllerle çapraz etkileşimini göstermektedir. Metin içinde detaylı anlatılmıştır.

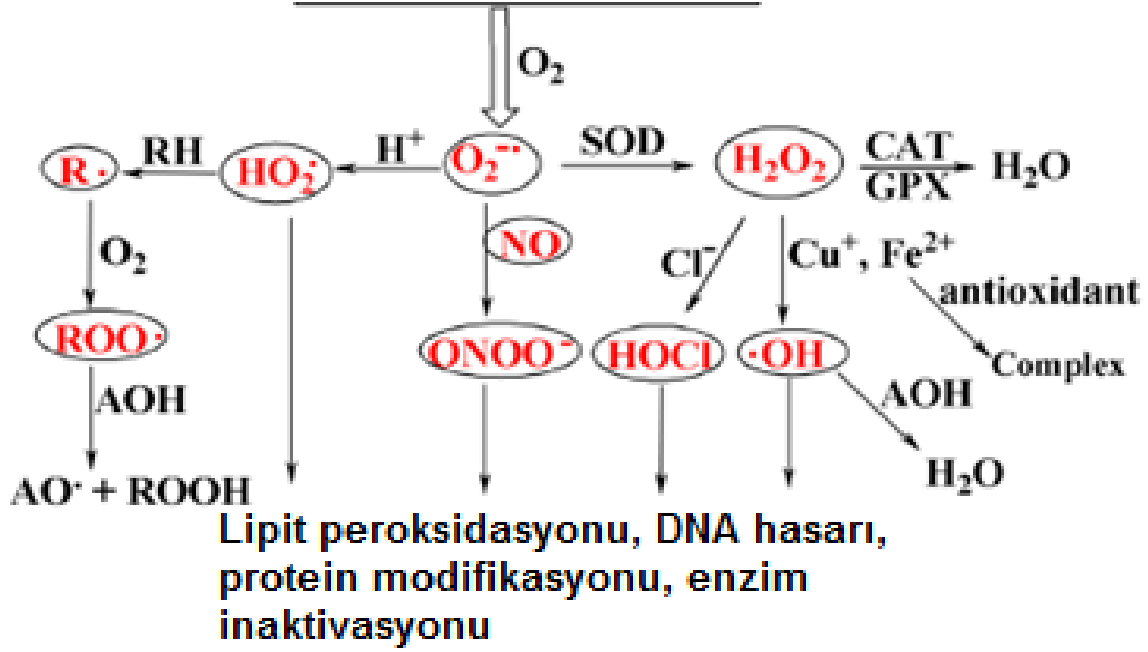
Smeets ve ark. [177] sazan (*C. carpio*) hepatositlerinde TCDD maruziyeti sonrası indüklenmiş CYP1A aktivitesine paralel olarak baskılanmış vitellogenin üretimi tespit etmişler, ancak bu baskılanmanın CYP1A aktivitesi maksimum indüklendiğinde ortaya çıktığı bildirilmiştir. TCDD'nin antiöstrojenitesinin CYP1A indüksiyonuyla değil, fakat AhR aktivitesi sonucu oluştuğu şeklinde açıklanmaya çalışılmıştır. Mortensen ve ark.'nın [187] yaptığı bir çalışmada ise, Atlantik somon balığı (*Salmo salar*) hepatositlerinde OH-PCB (hidroksi poliklorlubifenil) türevleri ve etinilöstradiolün AhR α , Arnt, CYP1A, UDPGT, GST ve CYP3A transkripsiyon seviyelerinde doz-bağımlı azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir.

CYP1 ailesinin biyobelirteç olarak kullanıldığı bir çalışmada, atıklarla kirlenmiş tropik mangrovların çevresinden toplanan Brezilya gupi balıklarında (*Poecilia vivipara*) kontrol grubuna göre, solungaçlarda CYP1A ve CYP1C1 ekspresyonunda 10-15 kat, karaciğerde CYP1B1 ekspresyonunda ise 23 kat artış tespit edilmiştir. Karaciğer CYP1A seviyeleri ise, CYP1B1 ve CYP1C1'e göre daha yüksek bulunmuştur [188]. Karaciğerde CYP1A ekspresyonunda tespit edilen 100 katlık artış, ekotoksikolojide CYP1A'nın bir kirlilik biyobelirteci olarak kullanılabileceğine dair görüşü güçlendiren bir literatür olarak kayıtlara geçmiştir. CYP1A ekspresyonu ve aktivitesinin regülasyonunda tespit edilen değişimler, birçok araştırmacı tarafından sazan balığında (*C. carpio*) [189]–[191], somon balığında (*Salmo salar*) [185], [187], [192], alabalıkta (*O. mykiss*) [186], [193], [194], kefalde (*Liza saliens*) [87], [195] ve çeşitli sucul organizmalarda [188], [196]–[198] ekosisteme bulaşan toksik karsinojenik maddeler ve kirliliğin boyutları hakkında bilgi sahibi olabilmek için bir biyobelirteç olarak kullanılmıştır.

1.5.2.2 Evrensel Radikal Temizleyiciler: SOD, GPx ve Katalaz

Reaktif oksijen türlerinin hücreye ve canlıya zarar vermesini engellemek için antioksidan metabolizmasında faz II enzim sistemi evrimleşmiştir. Hücre, oksijen radikallerinin detoksifikasyonunda faz II enzimlerinden mitokondri ve sitozolde lokalize olmuş süperoksit dismutaz (MnSOD ve Cu/ZnSOD), katalaz ve glutatyon peroksidazı kullanmaktadır. SOD süperoksit anyonlarını hidrojen perokside çevirir. Hidrojen peroksidin su ve moleküler oksijene dekompozisyonu ise katalaz tarafından gerçekleştirilir. Glutatyon peroksidaz ise hidrojen peroksidi suya çevirerek zararsız hale getirir [199]. Şekil 1.12'de SOD, GPx ve katalazın katalizlediği antioksidan metabolizması reaksiyonları gösterilmiştir.

**NADH/NADPH Oksidaz
Ksantin Oksidaz
Mitokondriyal vb.**



Şekil 1.12 Faz II Metabolizmada SOD, GPx ve Katalazın Metabolizması [200]

Antioksidan enzim süperoksit dismutaz süperoksitin detoksifikasyonunu yapabilen ökaryotik tek enzimdir. Sitoplazmik ve mitokondriyal süperoksit dismutaz enzimlerine ek olarak farelerde hücreler arası SOD sentezlenir. Bunun yanında, *Caenorhabditis elegans*'da beş SOD geni vardır. SOD-1, SOD-2 ve SOD-4 birincil sitoplazmik, mitokondriyal ve hücreler arası SOD genleridir. SOD-3 ve SOD-5 ise indüklenbilir mitokondriyal ve sitoplazmik SOD genleridir [201].

Süperoksit dismutazlar metalloenzimlerdir ve yapıları, hücresel yerleşimleri ve aktif yüzlerindeki kofaktörlere göre genellikle üç veya dört sınıfa ayrılırlar. Bunlar mangan SOD (MnSOD), bakır/çinko SOD (CuZnSOD), demir SOD (FeSOD) ve nikel SOD'dir (NiSOD). MnSOD mitokondride lokalize olmuştur [202]. CuZnSOD ökaryotik hücrelerde sitozolde bulunur ve iki tipik alt ünitesi vardır. Her alt ünite, enzimin aktif yüzünde bir bakır ve bir çinko atomu bulunur. Akciğer dokularında MnSOD sentezlenen transgenik farelerin oksijen toksisitesine karşı daha dirençli oldukları tespit edilmiştir [203]. MnSOD ve CuZnSOD'nin omurgasız deniz hayvanlarında doğuştan immün yanıtta görev aldıkları gösterilmiştir [202]. Hücreler

arası CuZnSOD'nin aşırı ekspresyonunda hücre içi peroksit içeriğinin azaldığı ve normoksi ve hiperoksi koşulları altında hücrenin replikatif yaşam ömrünü uzattığı bilinmektedir. Bu sonuçlar SOD'nin antioksidan savunmada farkedilir bir rolü olduğunu göstermektedir [203]. Doğal SOD ROS indüklü yaraları geciktirmede bir terapotik ajan olarak kullanılmaktadır, ancak dış kaynaklı SOD uygulamasının kimyasal kararsızlık, hızlı atılım, beyine girememe, düşük oral biyoyararlanım, özgün doku hedefleme ve immünojenisite gibi problemleri hala çözülememiştir [200]. SOD enzim aktivitesi sıklıkla birçok sucul organizmada bir ekotoksisite biyobelirteci olarak kullanılmaktadır [204], [205].

GPx ailesi selenosistein, triptofan, asparajin ve glutaminden oluşan korunmuş bir katalitik-tetratlı farklı gen ürünlerinden oluşur. Vertebratlarda selenosistein içeren beş formda GPx vardır. Bunlar sitozolik GPx1, gastrointestinal GPx2, hücreler arası GPx3, fosfolipit hidroperoksit GPx4 ve insan olfaktori-spesifik GPx6. GPx1-2-3 tetrametik iken, GPx4 monomeriktir. GPx4 ile GPx1'in bir milyar yıl önce filogenetik olarak ayrıldığı öne sürülmüştür [206]. Sazan balığında en yüksek GPx konsantrasyonu karaciğerde, en düşük GPx konsantrasyonu ise kas ve beyinde ölçülmüştür. GPx1 ve GPx2 sitozolik enzimlerdir. GPx1 tüm dokularda ifade edilirken, GPx2 özellikle barsak ve karaciğerde ifade edilir. GPx hücre membranının okside olmasını önlemede önemli rol oynamaktadır. GPx, redükte glutatyonla katalizleme yoluyla hücreyi ve çok hassas molekülleri serbest oksijen radikallerinin saldırısından korumaktadır [207].

Altı saatlik kadmiyum maruziyetinde, tüm doz gruplarında gpx ekspresyonu inhibisyona uğramıştır [208]. Sazan balığı hepatositlerinde antioksidan sistem yanıtı üzerine yapılan bir araştırmada, hepatotoksik mikrosistin-LR maruziyetinden 6 saat sonra SOD, CAT ve GPx önemli seviyelerde artış gözlenmiş, GST aktivitesinde ise anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. Antioksidan sisteminde görülen bu değişiklik, reaktif oksijen türlerinin aşırı birikmesi sonucu bu üç enzimin toksik radikallerin klerensinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir [209]. AHTN maruziyeti sonucu toprak solucanı SOD gen ekspresyonunda tespit edilen artış, 48. saatte maksimum seviyeye yükselmiş (1,87 kat); AHTN doz artışına bağımlı olarak ise 12. saatte 1,76 kat, 24. saatte ise maksimum seviyeye yükselmiş (1,89 kat), 48. saatte kontrol seviyelerinin altına düşmüştür [126]. Rotenonun sazan balıkları üzerinde oksidatif etkilerini araştıran bir çalışmada, aynalı sazanda

(*Hypophthalmichthys molitrix*) CYP1A (7 kat artış) ve GST ekspresyonunda artış, büyük kafalı sazanda (*Hypophthalmichthys nobilis*) CYP1A ekspresyonunda azalma gözlenmiş, yalnızca aynalı sazanda (*H. molitrix*) sitozolde bulunan GPx (33 kat), SOD1 (27 kat), CAT (28 kat) ve Hsp70 (32 kat) ekspresyonunda ise maruziyetin 6. saatinde önemli seviye artışları tespit edilmiştir [210]. Sazan balığı türleri arasında azinfosmetil gibi oksidatif ajanlara karşı en yüksek SOD aktivitesi *C. carpio*'da ve solungaç dokusunda tespit edilmiş [211], ancak diazinon maruziyetinde SOD ve hatta GPx aktivitesinin solungaçlarda indüksiyonu lipid peroksidasyonunu engelleyememiştir [212]. Simazin ile kronik maruziyet sonucu antioksidan aktivitedeki değişiklik üzerine yapılan bir çalışmada, *C. carpio*'da SOD, GPx, CAT ve GSH seviyelerinde 14. ve 28. günde anlamlı artış gözlenmiş, ancak 60 günden sonra seviyelerin normale döndüğü bildirilmiştir [213]. *C. carpio* juvenillerinde, bir organoklorlu pestisit olan endosülfan dozlamasında CYP1A ve SOD aktivitesinde anlamlı artış gözlenirken, CAT aktivitesi anlamlı derecede inhibisyona uğramış, fakat GPx, GR, G6PDH ve GST aktivitelerinde anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir [214]. Fitalat metabolizması sırasında hücrede biriken hidroperoksitler ile SOD, GPx, CAT gibi faz II enzimlerinin aktivitesinde, enzim tükenmesine bağlı olarak azalma [215], ancak doz bağımlı ve genellikle sub-akut dozlamalarda aktivite ve ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelebilmektedir [216]–[220]. Özellikle tatlı su balıkları gibi sucul canlılarda lipid peroksidasyonu, hidrojen peroksit oluşumu veya toplamda oksidatif stres artışı, SOD, GPx, CAT, GST gibi faz II enzimlerinin aktivite ve gen ekspresyon seviyelerindeki değişim, iç suların, nehir ve göllerin kirliliği hakkında yapılan araştırmalar için birer biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [221], [222].

1.6 Vitellogenin: Biyosentezi, Endokrin Bozucu Kimyasallarla İlişkisi ve Biyobelirteç Olarak Kullanılması

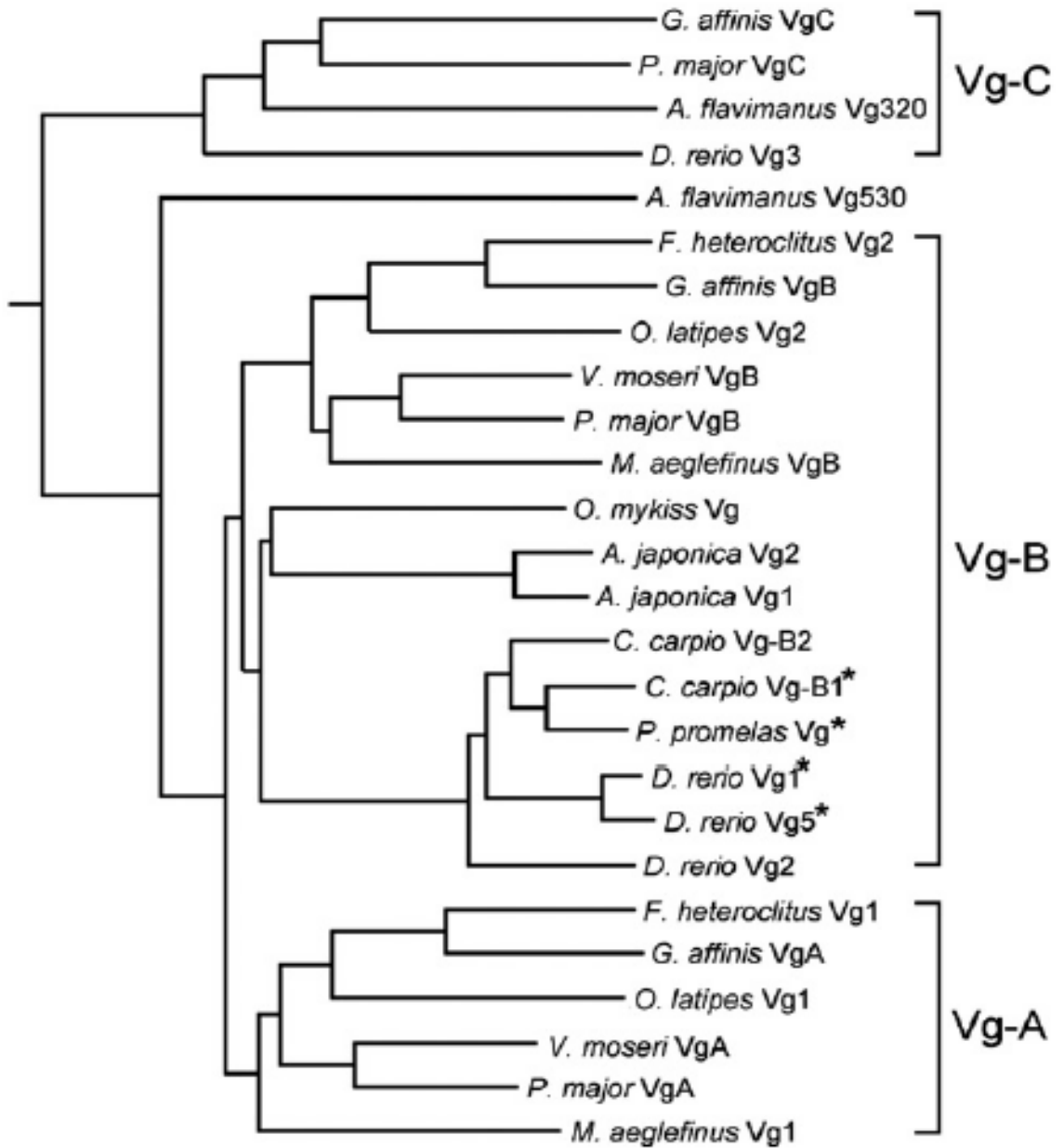
Vitellogenin (Vtg) ovipar organizmalarda östrojene karşı yanıt olarak üretilen, yumurta sarısının öncülüdür ve normalde erişkin dişilerin karaciğerinden salgılanır. Erkek bireyler Vtg genine sahip olmalarına rağmen Vtg proteinini sentezlemezler ya da çok düşük seviyelerde plazma Vtg seviyeleri gözlenebilir (alabalıkta 40 ng/ml, sazanda 550 ng/ml). Erkek bireyler doğal ya da antropojenik östrojenlere maruz kaldıklarında plazma Vtg seviyeleri 10-50 mg/ml'e kadar yükselir [223]. Vitellogenin dolaşım sistemini kullanarak gelişmekte olan yumurta hücresine reseptör-bağımlı endositoz ile girer. Oosit içerisinde vitellogenin proteolitik kesime

uğrar ve alt üniteler farklı kombinasyonda yeniden düzenlenir ve lipovitellini (Lv) oluştururlar. Lipovitellin ve vitellogenin geniş fosfoglikoproteinlerdir. Vitellogenin yapısal ve fonksiyonel olarak memelilerdeki apolipoprotein B (apoB) ve mikrozomal trigliserit transfer proteini (MTP) ile oldukça yüksek düzeyde benzerlik gösterir ve son yapılan çalışmalarla ortak evrimsel köklere sahip oldukları anlaşılmıştır [224].

Vitellogenin genleri motif ve altdomain varlıklarına göre sınıflandırılabilirler. Vitellogenin genleri bir sinyal peptidi, ağır zincir lipovitellin (LvH), fosvitin (Pv), hafif zincir lipovitellin (LvL), beta komponent ve C terminal kodlama bölgesi motifi ile beş homolog altdomain (HSD) içerebilmektedir. İlk üç HSD LvH'nin içinde bulunur ve tüm balık Vtg genlerinde korunmuş bir motiftir. Son iki HSD ise LvL içinde bulunur. Üç farklı Vtg geni vardır. Tip I Vtg geninde üç ana motif de bulunur (LvH, Pv ve LvL) ancak LvL içinde HSD IV ve HSD V yoktur. Tip II Vtg geninde üç motif ve beş HSD'nin hepsi bulunur. Tip III Vtg geninde ise Pv motifi ve HSD IV ile HSD V eksiktir [225]. Balık vitellogenini ise üç sınıfa ayrılmıştır. Önemli vitellogeninlerden biri tip A Vtg'dir. Diğer önemli tipi ise tip B Vtg'dir. Daha az yaygın olan tip C Vtg ise Pv domainine sahip değildir ve zebra balığı (*D. rerio*) Vtg-3 proteiniyle homoloji gösterir [226], [227]. Bu sınıflandırmaya göre sazan vitellogenini tip I Vtg-B olarak sınıflandırılır. Sazan (*C. carpio*) vitellogenini 160 kDa'luk önemli ve 180 kDa'luk daha az önemli (ya da yardımcı) iki polipeptitten oluşur [227]. Sazan Vtg-B2 geninin protein ürünü, sentezlenir sentezlenmez ya parçalanır ya da kana salgılandığında çok düşük seviyelerde tespit edilir. Bu yüzden Vtg-B2'nin negatif translasyonel regülasyon görevi olduğu öne sürülmüştür [227]. Şekil 1.13'de bazı teleost türlerinde tanımlanmış vitellogeninlerin evrimsel akrabalıkları gösterilmiştir.

Vitellogenin proteini transkripsiyonel düzeyde regüle edilir ve östrojen reseptörü α 'nın (ER α) karaciğerde aktive olmasıyla vtg geninden transkripsiyonu gerçekleşir [225]. Östrojen reseptörleri östrojen ve dış kaynaklı östrojenlerle (ksenoöstrojenler) regüle edilirler. Ksenoöstrojenlerden 17 α -etinilestradiol sentetik steroid bir hormon ve aynı zamanda bir ilaçtır. Güçlü östrojenik etkilerini ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olan östrojen reseptörleri aracılığıyla gösterir. Balıklardaki üç farklı östrojen reseptörüne de (ER α , ER β ve ER γ) bağlanabilir. Östrojen reseptörlerinin DNA'da östrojen-yanıt elementlerine (ERE) bağlanmaları sonucu östrojen yanıtı

oluşur [228]. Atlantik somon balığı (*Salmo salar*) juvenillerinde ve zebra balığında (*D. rerio*) yalnızca ER α 'nın Vtg ekspresyonuyla doğrudan ilişkisi bulunmuş ve Vtg indüksiyonunda anahtar molekül olduğu düşünülmüştür. Bunun yanı sıra, ER β 'nin östradiol yüksek bağlanma kapasitesine sahip olması, temel ER α seviyelerinin regülasyonunda görevli olduğunu düşündürmüştür [229]. *Xenopus* (kurbağa) ile yapılan çalışmalar, ardışık yapılan östradiol dozlamalarının Vtg mRNA transkripsiyon miktarında artış olarak östrojene yanıtta hafıza etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar östrojene yanıtta transkripsiyonel regülasyonun birkaç faktöre bağlı olduğunu göstermektedir [223].



Şekil 1.13 Teleost Balıklarda Vitellogeninin Evrimsel Analizi [227]

In vitro ve *in vivo* çalışmalar endokrin bozucu kimyasallarla maruziyetin erkek bireylerde vitellogenin ekspresyonunu ve östrojen yanıt genlerini indüklediğini ve plazma steroid seviyelerini değiştirdiğini, gelişimi engellediğini, hermafrodit bireylerin oluşmasına sebep olduğunu göstermiştir [225]. Su kaynaklarına bulaşan endokrin bozucu kimyasallar arasında bisfenol A, pestisitler, sentetik östrojenler, poliklorine bifeniller, fitalatlar ve alkilfenoller bildirilmiştir [228], [230]–[232]. Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı'nın (EPA) son belirlediği listeye göre endokrin bozucu kimyasallardan bazıları Tablo 1.10'da verilmiştir.

Tablo 1.10 Çevre Koruma Ajansının Bildirdiği Endokrin Bozucu Kimyasallar [232]

Kimyasalın Adı	CAS Numarası
2,4-D	94757
Abamektin	71751412
Aseton	67641
Atrazin	1912249
Benfluralin	1861401
Bifentrin	82657043
Bütil benzil fitalat	85687
Kaptan	133062
Karbaril	63252
Karbofuran	1563662
Klorprifos	2921882
Sipermetrin	52315078
Diazinon	333415
Dibütil fitalat	84742
Dietil fitalat	84662
Dimetil fitalat	131113
Disulfoton	298044
Endosulfan	115297
Imidakloprid	138261413
Metomil	16752775
Metil etil keton	78933
Metil paration	298000
Propargit	2312358
Propikonazol	60207901
Propizamit	23950585
Simazin	122349
Tebukonazol	107534963
Toluen	108883
Triadimefon	43121433
Trifluralin	1582098

Vitellogenin sentezi her ne kadar östrojen reseptörünün transaktif transkripsiyonel regülasyonu ile kontrol edilse de, poliaromatik hidrokarbonların, dioksinlerin, AhR agonistlerinin ve AhR-Arnt kompleksinin vitellogenin sentezinin seviyelerini çapraz etki ile değiştirebileceği ve inhibe edebileceği bildirilmiştir [194], [225], [233], [234]. Bununla birlikte metoksiklor gibi Vtg ekspresyonunu indükleyen ksenoöstrojenlerin metabolik aktivasyonu metoksi gruplarının demetilasyonu ile gerçekleşir ve bu reaksiyon sıçanlarda CYP1A, balıklarda CYP3A, insanlarda CYP1A2 ve CYP2C19 ile katalizlendiğinden, bu durumda sitokrom P450 enzim alt ailelerinin üyeleri indüklenirken bir yandan da vitellogenin ve diğer östrojen yanıt moleküllerinin sentezi indüklenebilir. *P. promelas*'da 17 β -östradiol ile muamelede doz bağımlı olarak maruziyetin 4. saatinde ani Vtg mRNA seviyesi değişimleri görülmüştür. Ancak plazmada Vtg proteinin tespit edilebilmesi 16. saatte gerçekleşmiştir [235]. Sucul organizmaları ve temiz su kaynaklarını tehdit eden endokrin bozucu kimyasalların canlı yaşamı üzerindeki olumsuz etkilerinin tespit edilmesinde kullanılan bir biyobelirteç olarak vitellogenin sentezi ve östrojen yanıtında gen ekspresyonunun regülasyonundaki değişimler, ovipar vertebratlarda birçok araştırmacı tarafından çalışılmış ve literatüre kullanışlı ve hassas bir biyobelirteç olarak geçmiştir [223], [225], [232], [236]–[240].

1.7 Bu Çalışmanın Amacı

Fitalatlar plastik gereçlerimizle, günlük hayatta ihtiyaç duyduğumuz birçok nesne ile, ilaç dolgu maddesi olarak, kozmetikte tırnak cilâsı, saç boyası ve parfüm kullanımıyla, oyuncak ve bilgisayar malzemeleri, vernik, biyosit ve tıbbî cihazlarla temas aracılığıyla sürekli maruz kaldığımız bir kimyasal ajandır. 2000'li yıllara kadar toksik etkilerine ve özellikle endokrin bozucu aktivitesine gereken önem verilmemesine ve sınırlama getirilmemesine rağmen, yakın zamanda Avrupa Komisyonu, Birleşik Devletler Çevre Koruma Ajansı ve Dünya Sağlık Örgütü'nün çabaları ile fitalatlara sınırlama getirilmiş, Avrupa'da oyuncak üretiminde kullanılması yasaklanmış ve nihayet ülkemizde de 2005 yılında oyuncakların yapımında kullanılmasına sınırlama getirilmiştir. Ancak gelişmekte olan ekonomilerde, karbon emisyonuna gösterilen üst sınırdan serbestlik mäsamaasında olduğu gibi, fitalatlar gibi hemen her üründe kullanılan, ancak ucuz

alternatifi olmayan kimyasal maddeler uluslararası yasalar çerçevesinde hali hazırda kullanılmaya devam etmektedir.

Fitalatlar gibi toksik ve biyoriitm bozucu maddelerin canlı organizmalar üzerindeki biyokimyasal, fizyolojik, anatomik, moleküler biyolojik ve patolojik olumsuz etkilerini tespit etmede kullanılan yöntemler arasında, bazı hayati önem arz eden biyolojik makromoleküllerin sentezi ve plazmadaki seviyeleri, hormon seviyeleri ve hormonal regülasyonu etkileyen moleküler ve fizyolojik mekanizmalarda anahtar görevi bulunan proteinler, reseptör ve transkripsiyon aktivatörleri, eşeyssel gelişimde görevli evrensel polipeptitler gibi biyomoleküllerin düzenlenmesindeki anormal değişimlerin tespit edilmesini içeren bir dizi yöntem sayılabilir. 21. yüzyıla kadar anatomik, patofizyolojik, histolojik ve biyokimyasal yöntemler sıklıkla kullanılmış olsa da, bilim ve teknolojiadaki artan ivmeyle süre gelen değişim ve gelişmeler, daha modern, daha güvenilir, daha pratik ve doğa ve canlı yaşamına daha saygılı yöntemlerin ekotoksikolojik araştırmalara entegre olmasını sağlamıştır. Modern yöntemler arasında; kantitatif PCR ve gerçek zamanlı PCR ile mRNA seviyelerinin belirlenmesi, western blotlama ve ELISA teknikleri ile protein seviyelerinin ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi, mikroçip teknolojisi ile aynı anda 500 genin birden küme ekspresyon analizinin yapılması sayılabilir. Toksikolojide enzim aktivitesinin ölçülmesi çoğu zaman güvenilir sonuçlar verse de, sonuçların yorumlanması pre-transkripsiyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel aşamalarda protein sentezinin regülasyonunu etkileyen ve değiştirebilen yeniden düzenlenimlerin ortaya çıkarılmasında yetersiz kalmaktadır. Moleküler biyokimyasal boyutta değişimlerin altında yatan aksiyon mekanizmalarını anlamak için tümdengelimci bilimsel bir yaklaşım sergilenmelidir.

Bu bağlamda, endüstriyel atıklarla çevreye oldukça yüksek miktarda bulaşan, toksik, strese bağlı ve endokrin bozucu etkileri olduğu bilinen fitalatlardan dibütil fitalatın, OECD'nin model sucül organizma olarak belirlediği sazan balıklarının (*Cyprinus carpio*) juvenillerinde (eşeyssel olgunluğa erişmemiş yavru) meydana getirdiği moleküler değişimlerin anlaşılması, yorumlanması ve seçilen proteinlerin regülasyonundaki değişimlerin, bu proteinlerin birer kirlilik biyobelirteci olarak literatüre sunulabilmesi amacıyla,

1. 70 kDa ısı şoku proteininin (Hsp70) mRNA ekspresyon ve protein seviyeleri,

2. Sitokrom P450 1A'nın (CYP1A) mRNA ekspresyon ve protein seviyeleri,
3. Vitellogeninin (Vtg) mRNA ekspresyon ve protein seviyeleri,
4. Süperoksit dismutaz (SOD) enziminin mRNA ekspresyon seviyeleri,
5. Glutasyon peroksidaz (GPx) enziminin mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimlerin ters transkripsiyon ve gerçek zamanlı PCR, western blotlama gibi moleküler ve biyokimyasal yöntemlerle tespit edilmesi ve karşılaştırmalı olarak yorumlanarak aksiyon mekanizmalarının aydınlatılması planlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Balık Materyalinin Temin Edilmesi ve Deney Planı

Sazan balıkları (*Cyprinus carpio*) Devlet Su İşleri Genel Müdürlüğü'nden (DSİ, Yedikır Baraj Gölü, Amasya, Türkiye) temin edilmiştir. Balıkların, sürekli havalandırmalı 150 litrelik cam akvaryumlarda 15 gün boyunca, 12 saat gece, 12 saat gündüz periyodunda ve oda sıcaklığında adaptasyonları sağlanmıştır. Balık beslenmesi için ticari yem kullanılmıştır. Di-n-bütil fitalat (DBP; Merck, asetonda 1 mg/l) dozlaması 4 saat, 24 saat ve 96 saat periyotlarında kontrol grubu harici deney gruplarına uygulanmıştır. Birer kontrol grubu eklenmiştir. Pozitif kontrol amaçlı β -östradiol indüksiyonu ise Sigma marka β -östradiolden (25 μ g/l, asetonda) hazırlanarak uygulanmıştır. Diseksiyon ve makroskobik gözlemden sonra juvenil sazanların (ortalama ağırlık 63,14 g \pm 18,9; ortalama uzunluk 15,87 cm \pm 1,59) solungaçları ve karaciğerleri etiketli alüminyum folyolara sarılarak sıvı azotta ani dondurma yapılmıştır. Ardından -80°C'lik dondurucuya konularak saklanmıştır. Deneylerde kullanılan sazan balığı için Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nca kabul edilen G. Ü. ET-07 numaralı ve 19 Eylül 2012 tarihli protokol uygulanmıştır. Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu ve Dünya Tıp Topluluğu Helsinki Deklarasyonu'nda bulunan deneysel prosedürler için belirlenmiş prensipler klavuzu izlenmiştir.

2.2 Su Parametrelerinin Ölçülmesi

YSI marka (51B model) arazi tipi oksijenmetre kullanılarak ölçümler yapılmıştır. pH 7,52, tuzluluk 0,12 ppt, sıcaklık 16,2°C, toplam sertlik 65 mg/l CaCO₃, çözünmüş oksijen 6,33 mg/l, iletkenlik 204,7 μ s/cm, toplam çözünmüş katı madde miktarı 159,9 mg/l, amonyak 1 mg/l'den fazla, nitrit 0,081 mg/l ölçülmüştür.

2.3 Enzimler ve Kimyasallar

Agaroz, kloroform, etidyum bromür, disodyum EDTA, sodyum dodesil sülfat, 2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propandiol (Tris), Tris-HCl, borik asit, izopropanol, abzolü etanol, metanol, glisin, bromfenol mavisi, gliserol, amonyum persülfat, akrilamid, bis-akrilamid, tetrametiletildiamintetraasetik asit (TEMED), Tween-20, sodyum klorür, Whatman 3MM kromatografi kağıdı, yağsız süt tozu, sekonder antikorlar, β -merkaptotanol, DEPC (Dietilpirokarbonat), BCIP/NBT, PMSF ve potasyum klorür Sigma'dan (ABD) temin edildi.

Gen Ruler 100 bp DNA markırı (6x jel yükleme tamponu ile birlikte tedarik edildi), “Fermentas Life Sciences” firmasından temin edildi.

BCA (bicinchoninic asit) total protein tayin kiti “Thermo Scientific” firmasından temin edildi. 0,2 µ’luk PVDF membran “Bio-Rad” firmasından temin edildi. Primer antikorlar “Cayman Chemical” firmasından temin edildi. Total RNA izolasyon kiti ve DNaz I enzimi, ters transkriptaz enzimi ve tamponu, “Faststart taq polimeraz SBYR Green Master” karışımı “Roche Diagnostics” firmasından temin edildi.

2.4 Metotlar

2.4.1 Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için kullanılacak bütün malzemeler önceden %0,1’lik DEPC ile muamele edildi; sonra otoklav ve/veya Pastör fırınında sterilize edildi. Havan ve tokmaklar sterilizasyondan sonra bir gece -80⁰C’de bekletildi. Yüzde %75’lik etil alkol (EtOH) şişeleri yarım olacak şekilde otoklavlandı. Çalışma alanı %70’lik EtOH veya %10’luk çamaşır suyu ile temizlendi. İzolasyon için Roche Diagnostics firmasının “Dokudan yüksek saflıkta total RNA izolasyon kiti (Kat. No. 12033674001)” kullanıldı. Total RNA izolasyonu üretici firmanın belirlediği ve aşağıda verilen protokole göre yapıldı.

1. 30 mg doku parçası havan ve tokmak ile, sıvı azot kullanılarak toz haline getirilir ve steril santrifüj tüpüne alınır.
2. 400 µl “Lizis/Bağlanma tamponu” eklenir ve bir kaç saniye vorteksle karıştırılır.
3. Lizat 2 dk maksimum hızda santrifüjlenir. Supernatan başka bir 1.5 ml’lik santrifüj tüpüne alınır ve üzerine 200 µl absolü etanol eklenerek karıştırılır.
4. Filtreli tp ve toplama tüpü i içe geçirilir, supernatan filtreli tüpün içerisine pipetlenir. Maksimum hızda 30 saniye santrifüjlenir ve filtrenin kuru olmasına zen gösterilir.
5. 90 µl “DNaz inkübasyon tamponu” ile 10 µl DNaz karıştırılarak filtreli tüpün içine pipetlenir. 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
6. 500 µl “yıkama tamponu I” solüsyonundan filtreli tüpün içerisine pipetlenir ve

8000 xg'de 15 saniye santrifüjlenir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır.

7. "Yıkama tamponu II" solüsyonundan filtreli tüpün içine pipetlenir ve 8000xg'de 15 saniye santrifüjlenir. Alt tüpte biriken atık sıvı boşaltılır.
8. 300 µl "yıkama tamponu II" solüsyonundan filtreli tübün içine pipetlenir ve maksimum hızda 2 dakika santrifüjlenir.
9. Filtreli tüp yeni bir toplama tübüne yerleştirilir ve 100 µl steril distile su filtreli tübün içerisine pipetlenir. 8000xg'de 1 dakika santrifüjlenir.
10. Alttaki tüp saf RNA'yı içermektedir. Solüsyon porsiyonlanarak -80°C'de saklanır.

2.4.2 Total RNA'nın Saflik Kontrolü ve Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Saf nükleik asit çözeltisi 230-320 nm dalga boyu arasında karakteristik bir absorbanza sahiptir. Saflaştırılmış RNA'nın saf olarak elde edilip edilmediğini anlamak için UV bölgesinde ölçüm yapma özelliğindeki spektrofotometrede 260 ve 280 nm'de absorban, kuvarz küvetlerde okundu (steril distile suya karşı) ve A260/A280 oranı hesaplandı. Seyreltme, 10 µL numunenin 990 µL distile su ile sulandırılmasıyla gerçekleştirildi.

Nükleik asitlerin UV ışığını absorbe etme yeteneğiyle okuma belirlenir. Maksimum absorban değeri 260 nm'dir. Aşağıdaki oranların dışındaki değerler kontaminasyonu gösterir. Absorbans değeri 1 ise bu yaklaşık 40 µg/ml tek zincir RNA'ya tekabül eder.

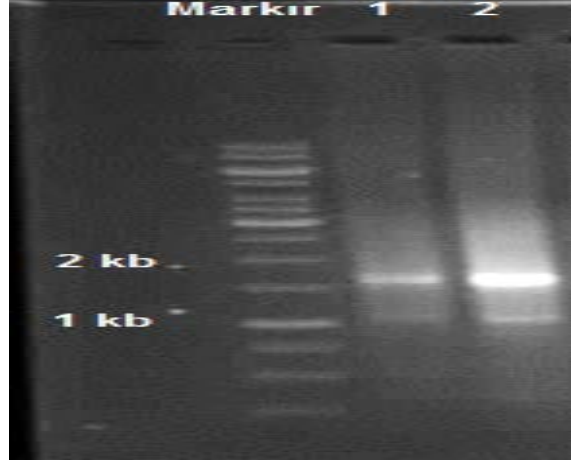
$$\text{RNA } \mu\text{g/mL} = A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40$$

Saf RNA numunesi için: A260/A280 ≥ 1,8-2,0

2.4.3 Total RNA Bütünlüğü Analizi

İzolatlardaki 18S ve 28S ribozomal RNA içerikleri, Gen Ruler 1 kb RNA markırı referans alınarak agaroz jelde kontrol edilmiştir. Her örnekten 8'er µl'lik miktar 1'er µl jel yükleme tamponu ile karıştırılarak, 3 µl 0,5 µg/ml etidyum bromür eklediğimiz ve mikrodalga fırında çözülerek hazırlanan %1,5'lik 50 ml agaroz jele yüklenerek, 0,5x TBE tamponu (50 mM Tris, 50 mM borik asit, 1 mM EDTA, pH:8,3) içerisinde, 5 V/cm'lik elektroforetik alanda (90 V) 1 saat yürütülmüş ve oluşan bantlar

Syngene Gene Genius Bio Imaging jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Şekil 2.1'de 18S ve 28S rRNA bantları görülmektedir.



Şekil 2.1 Agaroz jelde yürütülen total RNA izolatlarının 18S ve 28S rRNA bantlarının görüntüsü. Markır: 1 kb RNA markırı; 1: solungaçlardan elde edilen total RNA; 2: karaciğerden elde edilen total RNA.

2.4.4 Protein Homojenatlarının Hazırlanması ve Total Protein Tayini

Dokulardan protein homojenatları Lückstadt ve ark.'nın [241] yöntemine göre aşağıda anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

1. Dokular tartılır ve buz üzerinde makasla küçük parçalara ayrılır.
2. Parçalanmış dokular 2 mM EDTA (pH: 7.2) ve 0.1 mM PMSF içeren %1.15'lik KCl solüsyonunda (3 hacim) homojenize edilir.
3. Homojenizasyon "Heidolph bench top homojenizatör" ile 2400-3000 rpm'de, 1 dk boyunca gerçekleştirilir. Tüpün altına sürekli buz desteği sağlanır.
4. 10.800xg'de, 4⁰C'de 25 dk boyunca santrifüjlenir.

Supernatan hücre içeriğini ve çözünür fraksiyonları içermektedir. Supernatan steril 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak -80⁰C'de saklanır.

Protein homojenatlarının total protein tayinleri, Smith ve ark.'nın [242] belirlediği bicinchoninic asit (BCA) yöntemine göre yapılmıştır. BCA yöntemi, Cu⁺² kationunun alkali ortamda proteinler tarafından Cu⁺¹ küproz kationlarına indirgenmesinin bicinchoninic asit ile selektif kolorimetrik olarak 562 nm'de absorbans vermesi prensibine dayanmaktadır. BCA yöntemi, diğer yöntemlere göre protein içeriği varyasyonundan daha az etkilenir, diğer kolorimetrik

yöntemlere daha hızlı, pratik ve güvenilirdir. 5 µg/ml'e kadar hassasiyeti vardır ve protein saflaştırılmasında yüksek miktarda deterjan ve indirgeyici ajanların kullanılmasına olanak tanır.

Bu çalışmada "Pierce" firmasının "BCA Protein Tayin Kiti (Kat. No. 23225)" kullanılmış ve yönergeleri aşağıda verildiği gibi uygulanmıştır.

1. Albumin protein (Pierce, sığır serum albumini) standardı için 2 mg/ml'lik standart solüsyondan 25 µg/ml–2 mg/ml arasında seri dilüsyonlar hazırlanır.
2. BCA içeren reaktif A solüsyonunda 50 pay, %4 küprik sülfat içeren reaktif B solüsyonundan 1 pay olmak üzere karıştırılarak karanlık bir şişede çalışma reaktifi hazırlanır.
3. Mikroplak kuyularına standartlar veya bilinmeyen örneklerden 25'er µl pipetlenir.
4. Çalışma reaktifinden her kuyuya 200 µl pipetlenir ve plak 30 sn boyunca karıştırılır.
5. Plak sarılıp karanlık ortamda su banyosunda 37⁰C'de 30 dk bekletilir.
6. Plak oda sıcaklığına soğutulur ve plak okuyucusunda 562 nm'de absorbans ölçümü yapılır. Körün absorbansı, standart ve örneklerin absorbanslarından çıkarılarak ortalama-körle doğrultulmuş absorbanslar hesaplanır. Standart konsantrasyonlarına karşı absorbansları grafikte çizilir. $y = ax + b$ formülünden x çekilir ve örneğin konsantrasyonu regresyon eğrisi kullanılarak hesaplanır.

2.4.5 İki Basamaklı Gerçek Zamanlı (Real-time) PCR

Gerçek zamanlı PCR çalışmalarında hedef genin ekspresyon analizi rölatif değerler (ya da yarı kantitatif) hesabı üzerinden yapılır. Gen spesifik primerler kullanılarak SYBR Green I interkalasyon boyası varlığında, her PCR siklusu sonunda 530 nm'de floresan emisyonu ölçülerek spesifik mRNA'nın, izolattaki rölatif konsantrasyonu belirlenir. Bireyin referans geninin mRNA miktarları için, gerçek zamanlı PCR reaksiyonunun her basamağının sonunda elde edilen amplikonun SBYR Green I interkalasyonu sonucu yaptığı ışımının logaritmik olarak arttığı ve temel seviyeyi geçtiği noktada tespit edilen C_q (quantification cycle: ölçüm döngüsü) ya da C_t (threshold cycle: eşik döngüsü) değerinin, hedef

genin mRNA miktarları için tespit edilen Cq/Ct değerinden farkı alınır ve ΔCq bulunur. Bu değer $2^{-\Delta Cq}$ formülünde yerine konularak anlamlı ekspresyon değerleri hesaplanır. Çift zincirli DNA'ya interkalasyon özelliği olan SYBR Green I'in 530 nm'de tespit edilen ışımadaki artışla, her döngüde oluşan ampikon miktarı arasında korelasyon vardır. Grafikte seri standartların Cq değerlerine karşı, DNA miktarlarının logaritmik fonksiyonu yerleştirilerek bir standart eğri çizilir. R^2 değeri ve verim değerleri hesaplanır.

Real-time PCR ile gen ekspresyon analizi tek basamaklı ya da iki basamaklı yapılabilmektedir. Tek basamaklı reaksiyonda mRNA kalıp RNA görevi görür ve gen spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmak istenen bölgeye geri primerler bağlanarak ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA sentezi yapılır. Reaksiyon tüplerinin kapağı hiç açılmadan, termal döngü cihazına ardışık girilen PCR programı ile tümleşik bir PCR reaksiyonu yapılarak cDNA üzerinde bulunan hedef bölge aynı gen spesifik ileri ve geri primerler ile çoğaltılır. Tek basamaklı yöntemin avantajı zamandan tasarruf etmek, kullanım kolaylığı ve basamak sayısını indirerek kontaminasyonu azaltmak olsa da, iki basamaklı yöntemle göre koşulların optimize edilmesi daha zordur. İki basamaklı yöntemde, uzun reaksiyon sürelerinde enzimin optimum çalışma ömrünün kısıtlanması, daha fazla DNA polimeraz kullanılması, 10 kata kadar hassasiyet azalması, primer dimerlerinin birikerek SYBR Green I boyasıyla interferans yapması ve her gen bölgesinin çalışılmasında total RNA örneklerinin tekrar tekrar çözülüp-dondurulmasıyla RNA örneklerinin bütünlüğünün bozulması gibi dezavantajlarla karşılaşmamaktadır. İki basamaklı real-time PCR için birinci basamakta sentezlenen cDNA iki aya kadar -20°C 'de depolanabilmektedir. Her gen bölgesi için çözülüp-dondurmada RNA örneklerinde karşılaşılan degradasyona karşı iki basamaklı yöntem daha uygundur.

2.4.5.1 Ters Transkripsiyon ile cDNA (Komplementer DNA) Sentezi

"Roche Diagnostics" firmasının "Transcriptor Reverse Transcriptase (Kat. No. 03531287001)" enzimi kullanıldı ve üretici firmanın protokolü izlendi. cDNA sentezi reaksiyonu, 18 bazlık tek zincirli timin deoksinükleotit tekrarlarının primer olarak kullanıldığı ve total RNA'da bulunan mRNA'ların 3'-poly A kuyruklarından 5' ucuna doğru okuma yaparak 5' → 3' komplementer DNA (cDNA) sentezinin gerçekleştiği reaksiyondur. Reaksiyon sonunda ters transkriptaz (RT) enziminin RNaz H

aktivitesi ile kalıp RNA dizisi degradasyona uğrar ve ortamda sadece cDNA kalır. Firmanın önerdiği protokol aşağıdaki şekilde optimize edilerek kullanıldı.

Reaktif	Son konsantrasyon	Hacim
Distile su	-	20 µl'ye tamamlanır.
Kalıp RNA	1 µg	
Oligo (dT) primer	1 µM	1 µl

Hazırlanan solüsyon RNA'nın ikincil yapılarının denatürasyonu için 65°C'de 10 dk boyunca inkübasyona bırakılır. Ardından tüpler buza konulur. Aşağıdaki reaksiyon koşulları hazırlanarak RNA içeren tüpe eklenir ve reaksiyon tüplerinde son hacim 20 µl'ye steril distile su ile tamamlanır. 55°C'de 30 dk ve ardından 85°C'de 5 dk inkübasyona bırakılır. İlk inkübasyonda ters transkripsiyon, ikinci inkübasyonda ise "ters transkriptaz enziminin inaktivasyonu" gerçekleştirilir. "Ters transkriptaz" (RT) eklenmemiş kontrol için, RT enzimi eklenmemiş RT reaksiyonu inkübasyona bırakılır. Inkübasyon bitiminde tüpler buza konulur. -20°C'de depolanır.

Reaktif	Son konsantrasyon	Hacim
RT-reaksiyon tamponu (5x)	1x	4 µl
dNTP mix (10 mM)	1 mM	2 µl
RT-enzimi	10 U	0.5 µl

Elde edilen cDNA kontrol gruplarından 100'er ng alınarak cDNA havuzu oluşturulur ve seyreltmelerle 80 pg-250 ng cDNA arası bir standart serisi oluşturulur. Standartlar gerçek zamanlı PCR basamağında kalibrasyon eğrisinin çizilmesi ve verimin hesaplanmasında kullanılır.

2.4.5.2 Real-time PCR Koşulları ve Primer Dizileri

PCR reaksiyonu için hazırlanan mastır karışım "Roche Diagnostics" firmasından temin edilen "FastStart Essential DNA Green Master (Kat. No. 06402712001)" ürünü ile hazırlandı. Tablo 2.1 kullanılan primerleri ve PCR koşullarını göstermektedir. Primerlerin dizaynında Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) "Primer Blast" programından yararlanıldı. Primerler İontek firmasından (İstanbul, Türkiye) satın alındı. Primerlerin konsantrasyon ve bağlanma sıcaklıkları hesaplanan verime göre optimize edildi. DNA kontaminasyonlarını önlemek için mastır karışıma 0,2 U Urasil-DNA glikosilaz eklendi. Gen spesifik primerlerin konsantrasyonları, döngü sayıları ve sıcaklık dereceleri her gen bölgesi için ayrı ayrı optimize edildi. PCR karışımının son hacmi 20 µl'ye distile su ile tamamlandı.

Tablo 2.1 PCR Koşulları, Primerler ve Özellikleri

Gen	NCBI Giriş Numarası	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Amplikon Uzunluğu (bp)
HSP70	JN544930	İ 5'-CCACTGTCCCTGGGTATTGAAACC-3'	58	121
		G 5'-CACCGGGCTGGTTGTCTGAG-3'		
CYP1A	AB048939	İ 5'-CATCCCTTTCTTGCATCCTGC-3'	59	191
		G 5'-CGTTTGAGTTCTCATCCAGCTTCC-3'		
VTG	AB331884	İ 5'-GAAGCTATACCGATTGTGACTGGA-3'	57	86
		G 5'-TGCCAGGCAATTCCTTCCTG-3'		
SOD	AJ492825	İ 5'-GGCTTTGATAAGGACAGTGGAAGACT-3'	59	88
		G 5'-GAAGTGGGACGAGACCTGTAGTG-3'		
GPx	GQ376155	İ 5'-TGCAACCAGTTCGGACATCA-3'	57	84
		G 5'-GAAGCCATTTCCAGGACGGA-3'		
β-aktin	JQ619774	İ 5'-ATCCGTAAAGACCTGTATGCCA-3'	57	133
		G 5'-GGGGAGCAATGATCTTGATCTTC-3'		
EF-1α	AF485331	İ 5'-GTCAAGTCCGTTGAGATGCAC-3'	58	175
		G 5'-GGATGATGACCTGAGCATTGAAG-3'		
GAPDH	AJ870982	İ 5'-CGTGCTGCTTTCCAGTCCAAGAA-3'	58	136
		G 5'-CGCCTTCAGCCTTAACCTCACC-3'		

İ: İleri primer, G: Geri Primer

PCR döngüleri, ilk denatürasyon ve hot start enzimin aktive olması için 95⁰C'de 10 dk, 25-30 döngü (Cq değerlerine göre her gen için ayrı optimize edilmiştir) 95⁰C'de 30 sn, 57-59⁰C'de 30 sn, 72⁰C'de 30 sn olarak belirlenmiştir. Erime eğrisi analizi 60-95⁰C arasında 0,1⁰C/sn sıcaklık artış hızında ve sürekli floresan ölçülmesiyle gerçekleştirildi. Her PCR'da bir adet kalıp cDNA eklenmemiş ve bir adet ters transkriptaz eklenmemiş birinci basamak ters transkripsiyon ürünü örneği (genomik DNA kalıntısını tespit edebilmek için) çift negatif kontrol olarak eklenmiştir. Real-time PCR Roche Diagnostics firmasının "Nano Lightcycler" cihazı ve "Lightcycler ® Nano SW 1.0" programı ile yapılmıştır. Bir real-time PCR reaksiyonunun verimi $E = 10^{-1/\text{eğim}}$ (E: verim) formülü ile hesaplanır. Verimle doğrultulmuş Cq değerlerini hesaplamak için (E. corr.) $Cq = Cq[\text{Log}(1+E)/\text{Log}(2)]$ formülü kullanılır. Program eğimi ve verimi, verimle doğrultulmuş Cq, $2^{-\Delta Cq}$ ve anlamlı ekspresyon oranlarını hesaplayabilmektedir.

2.4.5.3 Referans Genin Seçilmesi

Spesifik mRNA seviyelerinin yorumlanması için her koşulda stabil ekspresyon seviyelerine sahip referans genlerin kullanılması gerekmektedir. Genel olarak kullanılan referans genlerden bazıları GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz), β -aktin, EF-1 α (elongation factor-1 α), 18S rRNA, β -2 mikroglobulin gibi genlerdir. Ancak bir canlı türü için belirlenen ve optimize edilen referans gen, bir başka canlıda aynı sonuçları vermeyebilir. Hatta aynı canlının gelişim aşamalarında bile farklılık gösterebilir. Bireyin farklı organlarında da farklılık görülebilir. Bu yüzden, real-time PCR ile gen ekspresyon analizlerinde genel referans gen seçmek yerine, her türde ve her organda ayrı olmak üzere referans genlerin denenmesi ve metodun her organa göre optimize edilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda 4. saat, 24. saat ve 96. saat kontrol ve DBP (1mg/l) doz gruplarından elde edilen solungaç ve karaciğer RNA'ları, housekeeping genlerden GAPDH, β -aktin ve EF-1 α ile denenmiştir. Sonuç olarak Cq değerleri Pfaffl ve ark.'nın [243] hazırladığı "BestKeeper©-ver.1" programına girilerek CV (coefficient of variation: varyasyon sabiti) çıktıları hesaplanmış ve grafik çizilmiştir. Buna göre, CV değeri en küçük hesaplanan gen referans gen olarak belirlenmiştir.

2.4.6 SDS-PAGE ve Western Blotlama

2.4.6.1 SDS-PAGE (Sodyum dodesilsülfat-poliakrilamid jel elektroforezi)

SDS-PAGE proteinlerin ayrıştırılmasında kullanılan analitik biyokimyasal bir yöntemdir. Jele yüklenen proteinler tek boyutlu olarak elektriksel alanda “-” kutuptan “+” kutuba doğru elektriksel yüklerine göre yürütülür. SDS ve β -merkaptoetanol ile muamele edilerek 80⁰C’de su banyosunda proteinler denatüre olurlar. Polipeptitlerin primer formları molekül uzunluğuna göre jelin porlarından geçerek “+” kutuba doğru sürüklenirler. Sonuçta polipeptitler molekül ağırlıklarına göre, jelin içerisinde ağırdan hafife doğru logaritmik mesafelerde konumlanırlar. SDS-PAGE protokolünde kullanılan solüsyonlar ve jel içeriği ile western blotlama ve immünodeteksiyonda kullanılan solüsyonlar Tablo 2.2’de verilmiştir.

Protein homojenatı SDS-PAGE ile Laemmli’nin [244] tanımladığı yönetime göre ayrıştırılmıştır. Ayrı tampon sistemiyle 10x10 cm’lik cam şekillendiriciler kullanılarak dökülen 1 mm kalınlığında sandviç poliakrilamid slab jel ile dikey elektroforez yapılmıştır. Jel yürütmede Biometra marka “Model PS304” güç kaynağı kullanılmıştır. Sandviçin cam levhaları sıkıştırıcıda sabitlenirken, etrafı agaroz eriyiğiyle mühürlenerek sıvı jelin dışarı çıkması engellenir. Tablo 2.2’de ayırıcı jel için yazılan malzemeler belirtilen sırada karıştırılır ve pastör pipeti yardımıyla sıkıştırılmış cam sandviçin içine pipetlenir. 10x10 cm’lik cam boyutuna göre sandviçin %70’i jel ile doldurulduktan sonra üzeri distile su ile kaplanarak sandviç ağzına kadar doldurulur. Suyun yoğunluğu jelden az olduğu için üst kısımda kalır ve jel yere paralel ve düzgün bir şekilde katılaşır. Jel katılaştıktan sonra istifleme jeli Tablo 2.2’de belirtilen malzemelerle hazırlanır ve pastör pipetiyle ayırıcı jelin üzerine pipetlenir. Jel katılaşmadan jelin içine doğru 20’li tarak yerleştirilir. Jel katılaştınca tarak çıkarılır ve sandviç sıkıştırma aparatıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirilir. Tankın üst ve alt tampon hazneleri 1x yürütme tamponu ile doldurulur. Her örnekten 60 μ g olacak şekilde ve 6x yürütme tamponuyla karıştırılarak jeldeki kuyulara protein karışımı yüklenir. İlk kuyuya 5 μ l protein standardı (Thermo Scientific, Kat. No. 26619) pipetlenir. “+” ve “-” kutuplara güç bağlantıları yapılarak akım verilir. 30 mA ve 150 V’da yükleme boyası jelin alt kısmına gelinceye kadar yürütülür. İşlem bittiğinde cam plakalar açılır ve jel elektroblotlama için hazırlanır.

Tablo 2.2 Western Blotlama Protokolünde Kullanılan Malzemeler

Kimyasallar/Reaktifler	Ayırıcı Jel (%8)	İstifleme Jeli (%4)	10x Yürütme Tamponu (pH: 8.3)	6x Yükleme Tamponu (pH: 6.8)	Trans-blot Solüsyonu (pH: 8.3)	TBS (pH: 7.6)
Akrilamid (%40) (ml)	1,92	0,48	-	-	-	-
Bisakrilamid (%2) (ml)	1,33	0,32	-	-	-	-
Tris HCl 1.5 M pH: 8.8 (ml)	2,5	-	-	-	-	-
Tris-HCl 1 M pH: 6.8 (ml)	-	0,63	-	-	-	-
%10 SDS (µl)	100	50	-	-	-	-
%10 APS (µl)	100	50	-	-	-	-
TEMED (µl)	6	5	-	-	-	-
Tris (g)	-	-	30,3	0,378 g	3,03	12,1
Glisin (g)	-	-	144	-	14,4	-
SDS (g)	-	-	10	1	-	-
Bromfenol mavisi (mg)	-	-	-	10	-	-
Gliserol (ml)	-	-	-	5	-	-
β-merkaptoetanol (ml)	-	-	-	1,25	-	-
Metanol (ml)	-	-	-	-	200	-
Sodyum klorür (g)	-	-	-	-	-	40
Distile su (ml)	4,05	3,46	1 l'ye tamamlanır	25 ml'e tamamlanır	650	5000

TBS: Tris-buffered saline (Tris-tamponlu tuz çözeltisi), **TEMED:** Tetrametiletildiamin, **APS:** Amonyum persülfat.

2.4.6.2 Elektroblotlama

Elektroblotlama işlemi, elektroforezde olduğu gibi jele yerleşmiş proteinlerin, elektrik alanında “-” kutuptan “+” kutuba doğru hareket ederek membrana göç etmesi ve immobilize olmasıdır. Elektroblotlama işlemi yarı-kuru blotlama cihazı (Thermo Scientific, Kat. No. 88217) ile gerçekleştirilmiştir. Protokol aşağıda verildiği gibi uygulanmıştır.

1. Whatman 3MM kromatografi kâğıdında jelin boyutlarına uygun olarak 4 adet hazırlanır. Yine aynı boyutlarda PVDF (poliviniliden diflorid) membran (Bio-Rad, Kat. No. 162-0177) kesilir. Bu basamaktan itibaren temiz eldiven kullanılmalıdır. Membran, kullanılmayacak köşelerinden temiz bir pens ile tutulmalıdır. Membran 0,2 µ olmalıdır, daha büyük por ölçüleri blotlanan protein moleküllerinin membrandan geçerek verimde kayıplar olmasına sebebiyet verebilir. Membran %100 metanolde 10 saniye bekletilir. Ardından distile suda 5 dk boyunca çalkalanır. Hemen ardından trans-blot (protein transfer tamponu) solüsyonuna daldırılıp 10 dk boyunca karıştırılarak dengelenir. Bu basamaktan sonra membran ıslak tutulmalıdır.
2. Jel ve filtre kâğıtları trans-blot solüsyonuna kısa bir süre için daldırılır ve doyurulur.
3. Trans-blot sandviç aşağıdan yukarıya doğru sünger, iki kat filtre kâğıdı, membran, jel, iki kat filtre kâğıdı ve sünger olmak üzere hazırlanır. Yarı-kuru elektroblotlama cihazında üst kapak (-) kutup, alt tabla ise (+) kutup olmalıdır. Cihazda kutuplar ters ise, sandviç de ters çevrilmelidir, çünkü akım (-) kutuptan (+) kutba doğru geçecek, proteinleri jelden membrana bu yönde aktaracaktır.
4. Sandviç transfer tamponu ile sürekli ıslak tutulmalıdır. Filtre kâğıtları ve membran arasında kesinlikle hava kabarcıkları kalmamalıdır. Bunun için silindirik biçiminde cam pipetler kullanılabilir.
5. En son hizayı bozmayacak şekilde jelin üstüne iki kat filtre kâğıdı ve sünger konulur. Süngerler ve filtre kâğıtları, alttaki filtre kâğıtları ve süngerlere temas etmeyecek şekilde kesilmelidir. Aksi takdirde akım kısa yolu tercih edecek ve protein blotlama başarısız olacaktır.

6. Yarı-kuru elektroblotlama cihazının kapağı açılır ve sandviç transfer çemberine yerleştirilir. (+) Kutbun membran tarafına bakmasına dikkat edilmelidir.
7. Akım şiddetini 30 mA (veya 20 V) ayarlayarak elektroblotlama başlatılır ve 3 saat süreyle sabit akım verilir (soğutma ya da soğuk tampon desteği yapılmalıdır).
8. Blotlama sonunda sandviç ayrılır ve membran pens ile tutularak alınır
9. Membran TBS (Tris-tamponlu salin) tamponunda kısa bir süreliğine çalkalanır. Hemen ardından %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (%0,1'lik Tween-20 içeren TBS tamponu) tamponuna atılır ve 2 saat çalkalanarak inkübe edilir. Bu, membranı doyurma basamağıdır ve non-spesifik etkileşimleri indirger.

2.4.6.3 İmmunodeteksiyon (Kolorimetrik Yöntem)

Kolorimetrik yöntemde, ikincil antikora konjuge olan raportör enzimle reaksiyona giren renk verici bir substrat, görünür ışıkta kahverengi ya da lacivert renk veren çökelti oluşturur. Primer antikor membrandaki hedef proteinine bağlanmış, sekonder antikor da primer antikora bağlanmış olduğundan membranda sabitlenmişlerdir. Oluşan renkli çökelti de protein bantlarının üzerinde belirir. Proteine bağlanan antikor miktarı protein miktarıyla doğru orantılı olduğundan, oluşan renkli çökeleğin de yoğunluğu protein miktarıyla korelasyon gösterir. Böylelikle fotoğraf makinesiyle çekilen fotoğraf üzerinde yoğunluk analizi yapılabilir. Kolorimetrik yöntem Ey ve ark.'nın [245] yöntemine göre aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

1. Membran 10'ar dk'lık yıkamalarla 5 kez çok miktarda TBS-T tamponu ile çalkalanarak yıkanır.
2. %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T tamponunda, 1:1000 veya 1:2000 seyreltilerek anti-X protein antikor (farede) hazırlanır.
3. Membran, antikor solüsyonunda 4⁰C'de gece boyu çalkalayarak inkübe edilir.
4. Hemen ardından 10'ar dk'lık yıkamalarla 5 kez çok miktarda TBS-T tamponu ile çalkalanarak yıkanır.

5. %5 yağsız süt tozu içeren TBS-T tamponda, 1:10000 (veya 1:5000) seyreltilerek anti-fare alkalın fosfataz-konjugat sekonder antikor hazırlanır.
6. Membran, hazırlanan konjugat TBS-T solüsyonunda 2 saat çalkalanarak inkübe edilir.
7. Membran, TBS-T ile 3 kez 10'ar dk'lık çalkalamalı inkübasyona bırakılır. Ardından 2 kez 10'ar dk'lık çalkalamalı TBS inkübasyonu yapılır.
8. Renk geliştirme ajanı BCIP/NBT (5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolyum) (Sigma-Aldrich, Kat. No. B6404) ile membran muamele edilir. Bantlar görünür olunca derhal bu solüsyondan çıkarılır, aksi takdirde karanlık bir membran elde edilir.
9. Renk geliştirme ajanı dökülür ve membran TBS ile 10 dk çalkalanarak yıkanır.

Jel görüntüleme cihazında, membran kurumadan ve renk solmadan derhal fotoğraf çekimi yapılmalıdır. Protein bantları ABD (Amerika Birleşik Devletleri) 'Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (NIH) internet sayfasından indirilen "ImageJ 1.47v" programı yardımıyla yaklaşık pik alanları hesaplanarak değerler kaydedilmiştir.

2.4.7 İstatistiksel Hesaplamalar

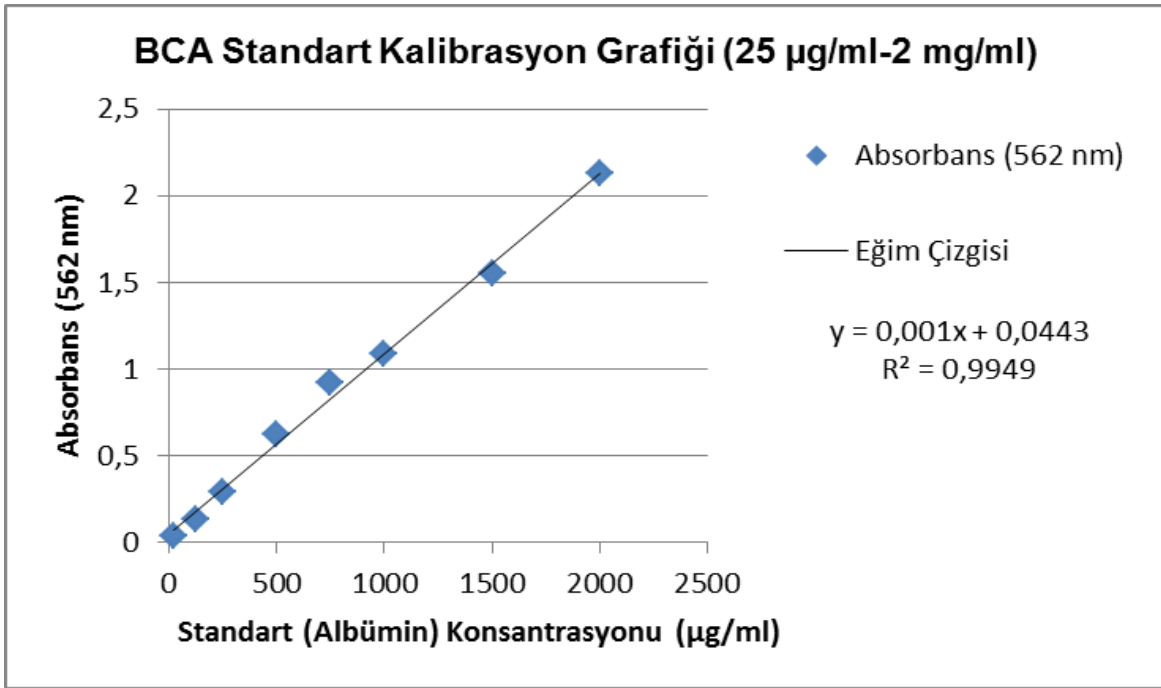
İstatistik hesaplamaları, gruplar arası ortalamaların farkını belirlemek için "Graphpad Prism 5.01" (California, ABD) istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama oran ve standart hata olarak verildi. İki grup arasındaki karşılaştırmalar parametrik Student's *t* testi ve eşit olmayan varyanslarda nonparametrik Mann-Whitney U testi ile, ikiden fazla grup arasındaki karşılaştırmalar ise tek yönlü ANOVA; istatistiki olarak anlamlı sonuçlarda ANOVA'yı takiben gruplar arası anlamlı farkı karşılaştırmak için Tukey's post hoc test yapıldı.

3. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Deney süresince deney, kontrol ve pozitif kontrol gruplarında balıklarda ölüm gözlenmemiş, balıklar türe özgü normal davranışlar sergilemişlerdir.

3.1 Protein Miktar Tayini Sonuçları ve Standart Kalibrasyon Grafiği

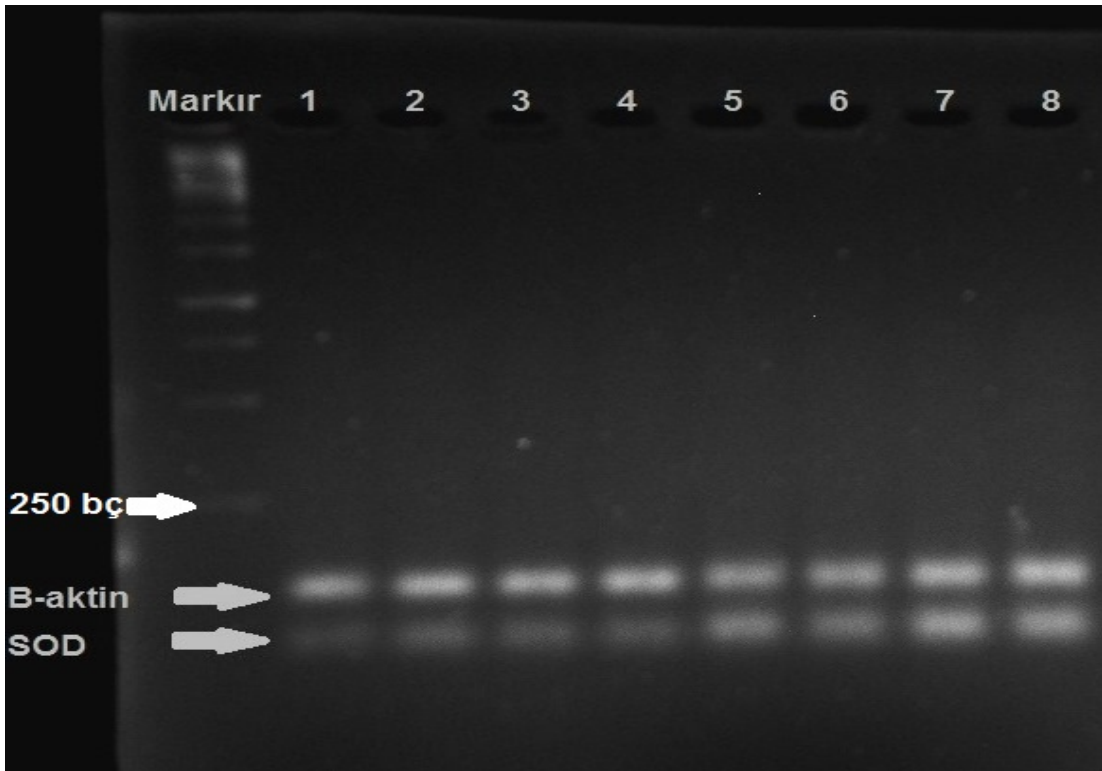
Uygulanan BCA protokolüne göre çizilen standart kalibrasyon grafiği Şekil 3.1'de verilmiştir. Eğimi hesaplamak için Excel tabanlı grafikten yararlanılmıştır. Eğim çizgisi eklendikten sonra grafik üzerinde $y = 0,001x + 0,0043$ eşitliği belirlenmiştir. Bu eşitlikten yararlanılarak her örneğin konsantrasyonu x (konsantrasyon) örneğin absorbansına (y) göre "µg/ml" cinsinden hesaplanmıştır. Protein konsantrasyonları dilüsyon faktörü (10 kat) ile çarpılarak 10000-17000 µg/ml arasında hesaplanmıştır.



Şekil 3.1 BCA Metoduyla Belirlenen Standart Kalibrasyon Grafiği. y: absorbans, x: konsantrasyon, R^2 : Hata değeri.

3.2 Real-Time PCR Analizleri

DBP (1 mg/ml) maruziyetinin juvenil sazan balıklarının solungaç ve karaciğer dokularında stress proteinleri Hsp70, CYP1A, SOD, GPx ve Vtg üzerine moleküler düzeyde etkileri araştırılmıştır. Günümüzde SYBR Green I ışımalarını ölçerek yarı kantitatif sonuçlar veren Real-time PCR tekniği kullanılarak hassas, tekrarlanabilir, doğruluğu yüksek ve konvansiyonel PCR işlemlerinde karşılaştığımız zaman kaybettirici ve hassas olmayan jel bazlı ekstra işlemlere gerek duymadan gen ekspresyon analizi ve karşılaştırması yapılabilmektedir. Şekil 3.2'de Real-time PCR analizi sonrası %1'lik agaroz jelde yürütülen ampliconların çekilen fotoğrafı görülmektedir.

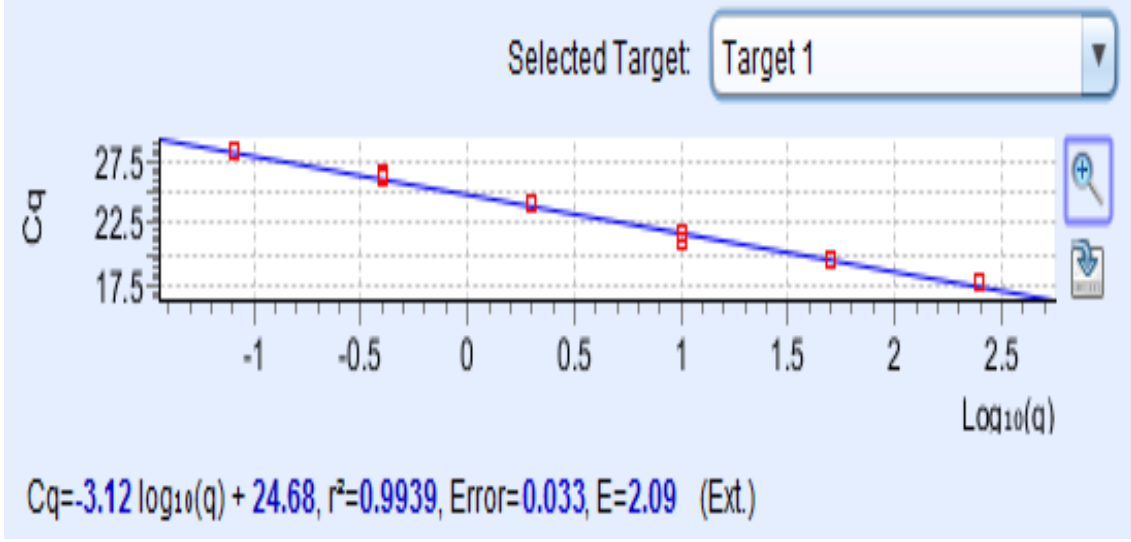


Şekil 3.2 Real-time PCR Analizi Sonrası Ampliconların Agaroz Jeldeki Görüntüsü. Markır: 1 kb'lık DNA Molekül Ağırlık Markırı, 1-4 arası kuyucuklar kontrol grubu, 5-8 arası kuyucuklar DBP deney grubu.

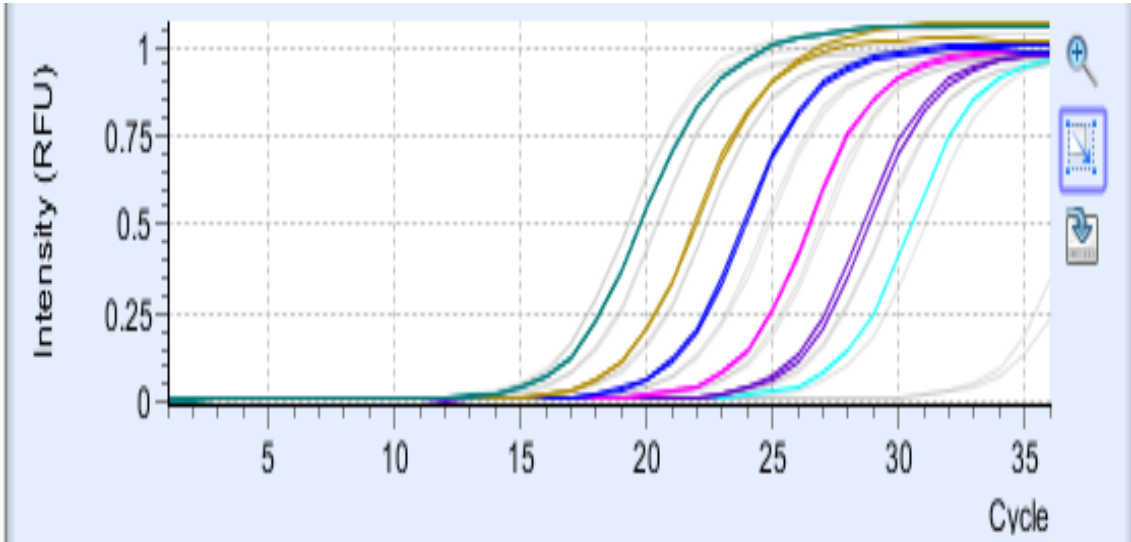
3.2.1 Real-Time PCR Standart Kalibrasyon Grafiği

Kontrol cDNA havuzundan yapılan seri seyreltmelerle 80 pg ve 250 ng arasında 5 katlı dilüsyonlar yapılarak standart kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Standart kalibrasyon grafiği deneyler arasındaki çeşitliliği azaltmak için çizilir. Her standart dilüsyonun konsantrasyonunun logaritmik fonksiyonuna karşı Cq değerinin grafikte

yerleştirilmesiyle elde edilen doğrusal çizgi standart kalibrasyon eğrisidir. Amplifikasyon ve standart kalibrasyon grafikleri Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir.



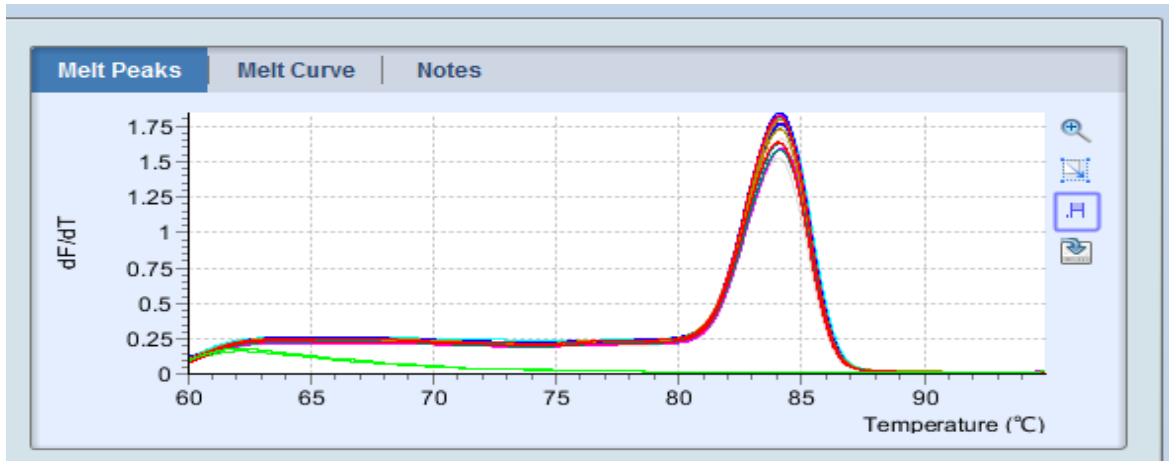
Şekil 3.3 Kontrol cDNA havuzundan 5 katlı seyreltilmiş standartların PCR reaksiyonu sonucu belirlenen Cq değerlerine karşı çizilen standart kalibrasyon grafiği. Hata 0,033 ve eğim -3,12 hesaplanmıştır. Verim= $10^{-1/\text{eğim}}$ formülünden 2,09 olarak hesaplanmıştır. Program verim hesabını otomatik olarak yapmaktadır.



Şekil 3.4 Standart dilüsyon amplikonlarının Cq değerlerini gösteren grafik

3.2.2 Real-Time PCR Amplikonlarının Erime Eğrisi Analizi

Real-time PCR ürünlerinin özgünlüğünü anlayabilmek için PCR reaksiyonu tamamlandığında erime eğrisi analizi yapılır. Her çift zincirli DNA'nın özgün bir erime derecesi vardır. PCR reaksiyonu bittiğinde, PCR tüpleri 0,1 °C/sn hızla ısıtılırlar. Özgün erime derecesine, yani amplikonların yarısının denatüre olduğu sıcaklığa gelindiğinde okunan floresan ışımaya, SBYR Green I boyasının hedef çift zincirli DNA'dan ayrıldığı sıcaklıktır. Sıcaklığa karşı boyanın floresan ışımalarının negatif türevi alınarak grafiği çizildiğinde Şekil 3.5'deki gibi bir tepe noktası olan grafik elde edilir. Amplikonlar arasında özgün olmayan ürünler varsa, bunlar belirlenen özgün sıcaklık aralığından sapma gösterir. Erime pikleri keskin olmalı ve birbirleri üzerine binmelidir. Bu yöntemle kontaminasyonlardan ya da primer dimerlerinden kaynaklanan özgün olmayan amplifikasyonlar pratik olarak saptanabilmektedir.

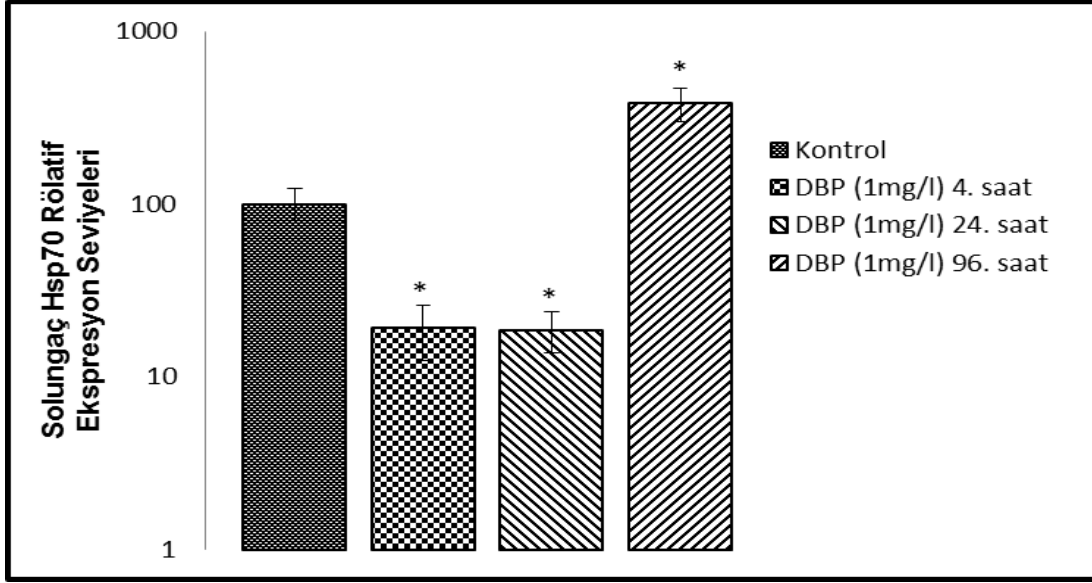


Şekil 3.5 Erime piklerinin negatif türevleri alınarak çizilen grafik. Sıcaklığa karşı SBYR Green I floresan ışımaya değerleri çizilmiştir. Tek sıcaklıkta üst üste binmiş pikler tek tip PCR ürünlerinin tespit edildiğini göstermektedir. Yeşil hat negatif kontrolleri temsil etmektedir.

3.2.3 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Hsp70 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

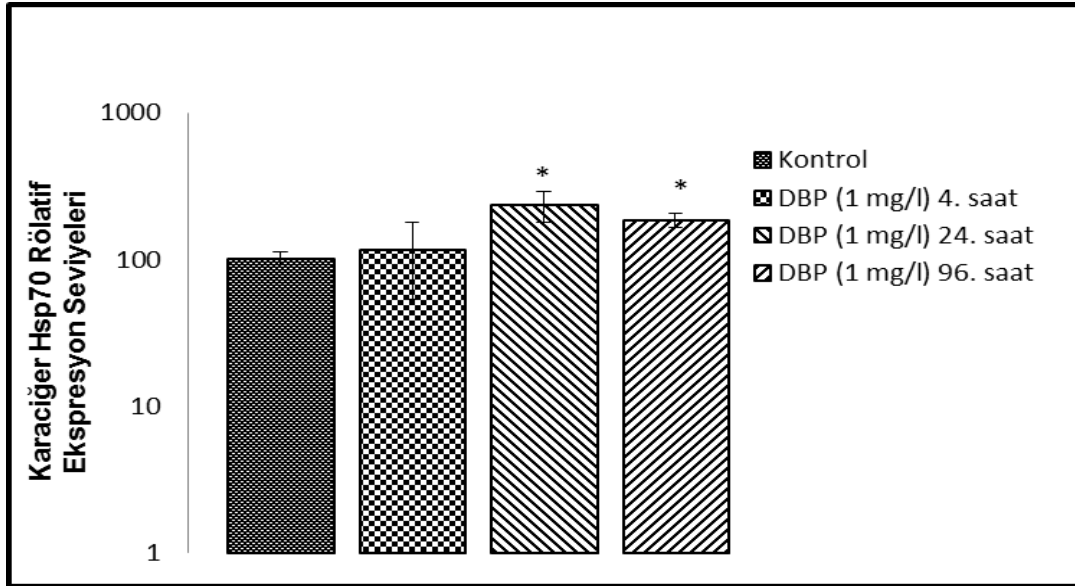
Kontrol grubu solungaçlarda 4. saatte Hsp70 mRNA seviyeleri $0,075 \pm 0,021$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0145 \pm 0,005$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarda 24. saatte Hsp70 mRNA seviyelerinin $0,0405 \pm 0,0089$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olduğu bulunurken, 24. saatte DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0075 \pm 0,0020$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=7) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarda 96. saatte Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0056 \pm 0,0010$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=5) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0215 \pm 0,0047$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) bulunmuştur. DBP muamelesi sonucu 4. ve 24. saatlerde Hsp70 mRNA seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalırken (5,17 ve 5,4 kat) ($p < 0,05$), 96. saatte kontrol grubuna göre anlamlı artış 3,83 kat hesaplanmıştır ($p < 0,05$). Şekil 3.6'da solungaç Hsp70 mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.

Karaciğer dokularında ise 4. saat kontrol grubu Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0295 \pm 0,0225$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0342 \pm 0,0185$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0306 \pm 0,0036$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6), 24. saat DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0721 \pm 0,0168$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0072 \pm 0,0013$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda Hsp70 mRNA seviyeleri $0,0134 \pm 0,0016$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=8) bulunmuştur. Kontrol ve DBP deney grupları arasındaki fark 4. saatte anlamsız bulunurken ($p > 0,05$), 24. ve 96. saatte DBP deney gruplarında kontrol gruplarına göre Hsp70 mRNA seviyeleri sırasıyla 2,35 katına ve 1,85 katına çıkmıştır ($p < 0,05$). Şekil 3.7'de karaciğer Hsp70 mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.6 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında solungaç Hsp70 gen ekspresyonu. Hsp70 ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$



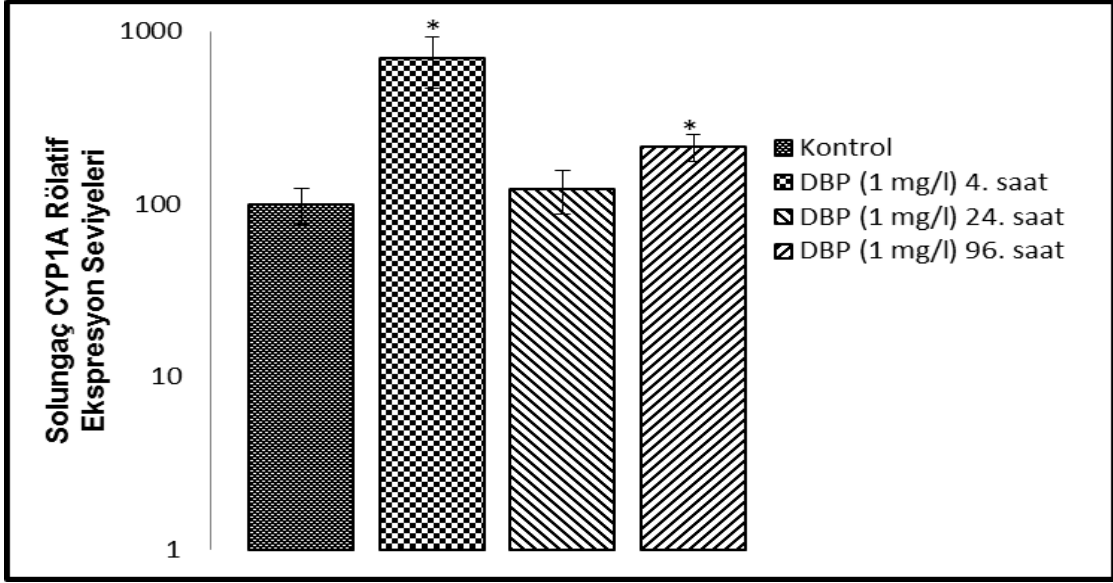
Şekil 3.7 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında karaciğer Hsp70 gen ekspresyonu. Hsp70 ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

3.2.4 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak CYP1A Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

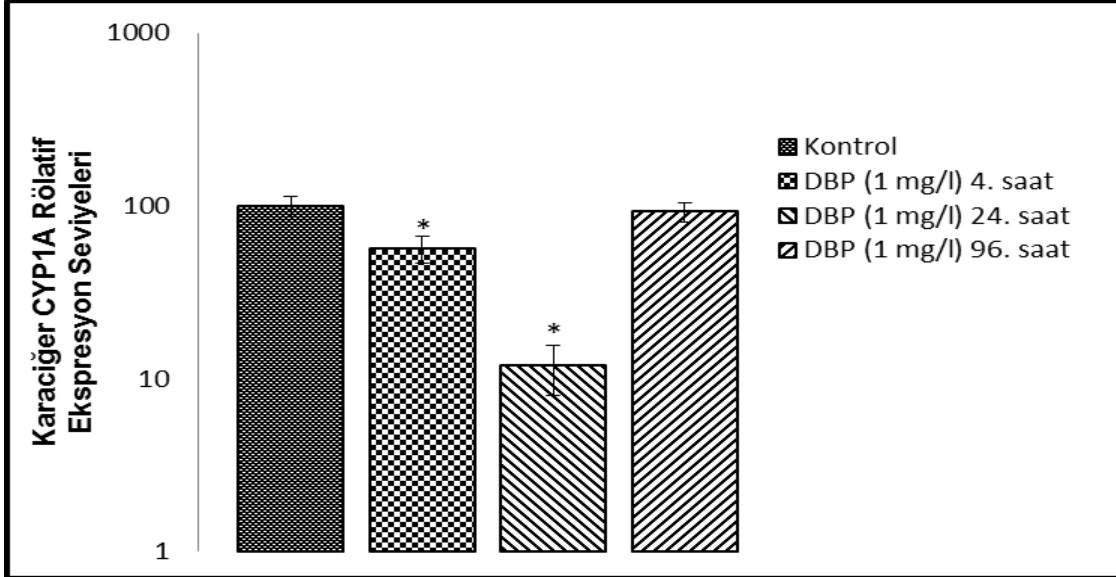
Kontrol grubu solungaçlarında 4. saatte CYP1A mRNA seviyeleri $0,0228 \pm 0,0053$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda CYP1A mRNA seviyeleri $0,1595 \pm 0,0521$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol solungaçlarında 24. saatte CYP1A mRNA seviyelerinin $0,0109 \pm 0,0031$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olduğu bulunurken, 24. saat DBP deney grubunda CYP1A mRNA seviyeleri $0,0133 \pm 0,0038$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=7) olarak hesaplanmıştır. Kontrol solungaçlarında 96. saatte CYP1A mRNA seviyeleri $0,0092 \pm 0,0022$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=5) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda CYP1A mRNA seviyeleri $0,0198 \pm 0,0035$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) bulunmuştur. DBP maruziyeti sonucu 4. saatte CYP1A mRNA seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede (7 kat) artarken ($p < 0,05$), 24. saatte ölçülen artış (1,22 kat) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$). Kontrol grubuna göre anlamlı fark 96. saatte 2,15 kata çıkmıştır ($p < 0,05$). Şekil 3.8'de solungaç CYP1A mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.

Karaciğer dokularında 4. saatte kontrol grubu CYP1A mRNA seviyeleri $0,8238 \pm 0,1158$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda CYP1A mRNA seviyeleri $0,4660 \pm 0,0805$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte CYP1A mRNA seviyeleri $0,3937 \pm 0,1472$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6), DBP deney grubunda 24. saatte CYP1A mRNA seviyeleri $0,0465 \pm 0,0148$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte CYP1A mRNA seviyeleri $0,1873 \pm 0,0485$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanırken, 96. saat DBP deney grubunda CYP1A mRNA seviyeleri $0,1723 \pm 0,0224$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=8) bulunmuştur. Kontrol gruplarına (4. ve 24. saatte) göre DBP deney gruplarında CYP1A mRNA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı seviyede (1,76 ve 8,46 kat) azalırken ($p < 0,05$), 96. saatte bu azalma 1,08 kata indirgenmiştir, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,05$). Şekil 3.9'da karaciğer CYP1A mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.8 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saatte deney gruplarında solungaç CYP1A gen ekspresyonu. CYP1A ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$



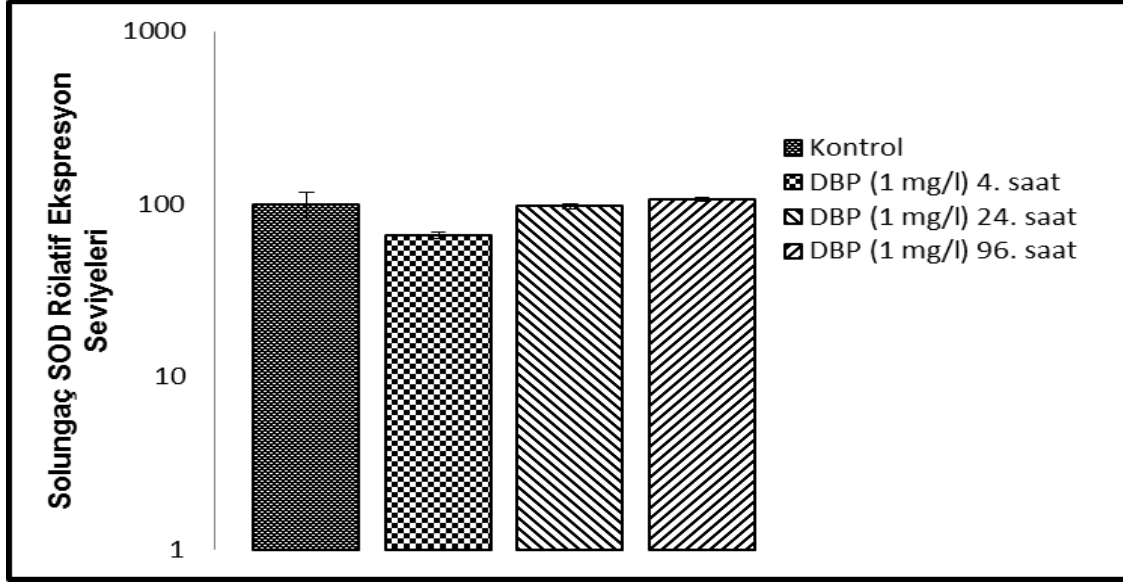
Şekil 3.9 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer CYP1A gen ekspresyonu. CYP1A ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

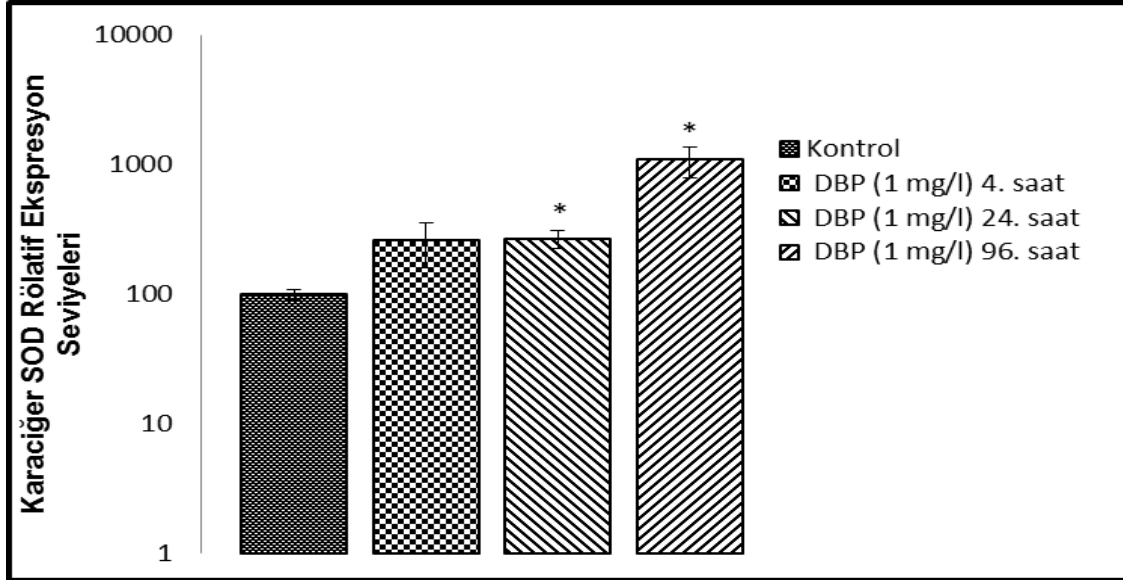
3.2.5 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak SOD Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Kontrol grubu solungaçlarında 4. saatte SOD mRNA seviyeleri $0,1305 \pm 0,0226$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda SOD mRNA seviyeleri $0,0865 \pm 0,0038$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 24. saatte SOD mRNA seviyelerinin $0,0676 \pm 0,0045$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olduğu bulunurken, 24. saat DBP deney grubunda SOD mRNA seviyeleri $0,0653 \pm 0,0026$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=7) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 96. saatte SOD mRNA seviyeleri $0,0844 \pm 0,0139$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=5) olarak hesaplanırken, 96. saat DBP deney grubunda SOD mRNA seviyeleri $0,0895 \pm 0,0024$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) bulunmuştur. DBP muamelesi sonucu 4., 24. ve 96. saatlerde SOD mRNA seviyelerinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede değişimler gözlenmemiştir ($p>0,05$). Şekil 3.10'da solungaç SOD mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.

Karaciğer dokularında 4. saatte kontrol grubu SOD mRNA seviyeleri $43,57 \pm 4,041$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda SOD mRNA seviyeleri $112,4 \pm 42,74$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte SOD mRNA seviyeleri $9,236 \pm 3,750$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6), 24. saatte DBP deney grubunda SOD mRNA seviyeleri $24,69 \pm 3,698$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte SOD mRNA seviyeleri $17,55 \pm 6,204$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda 96. saatte SOD mRNA seviyeleri $190,0 \pm 49,99$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=8) bulunmuştur. Kontrol grubuna göre DBP deney grubunda 4. saatte SOD mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmezken ($p>0,05$), 24. ve 96. saatte kontrol gruplarına göre DBP deney gruplarında SOD mRNA seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiştir (2,67 ve 10,82 kat, $p<0,05$). Şekil 3.11'de karaciğer SOD mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.10 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında solungaç SOD gen ekspresyonu. SOD ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.



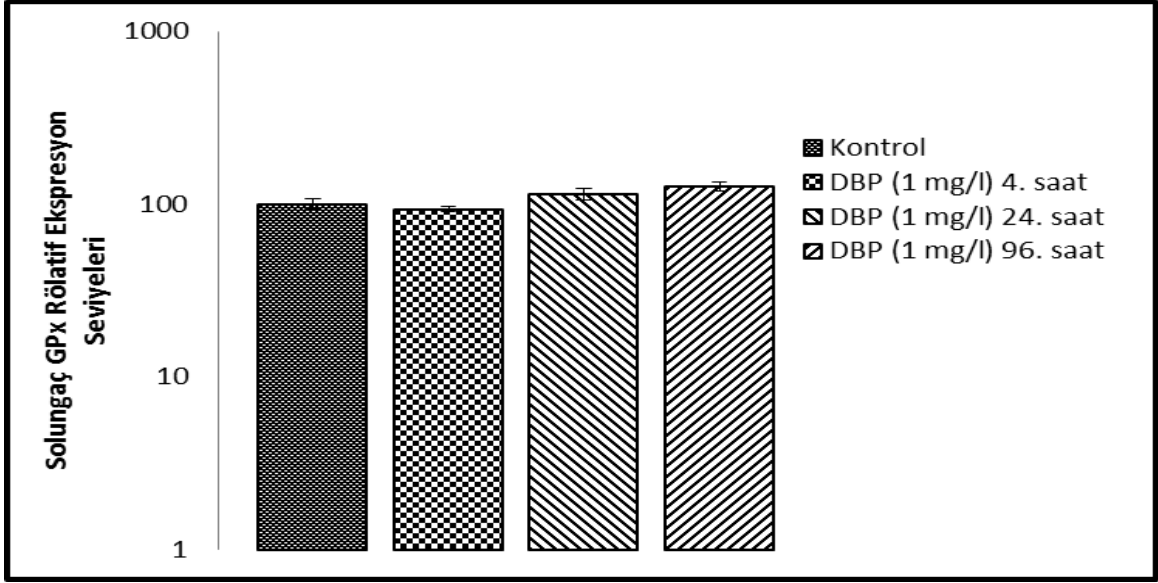
Şekil 3.11 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer SOD gen ekspresyonu. SOD ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

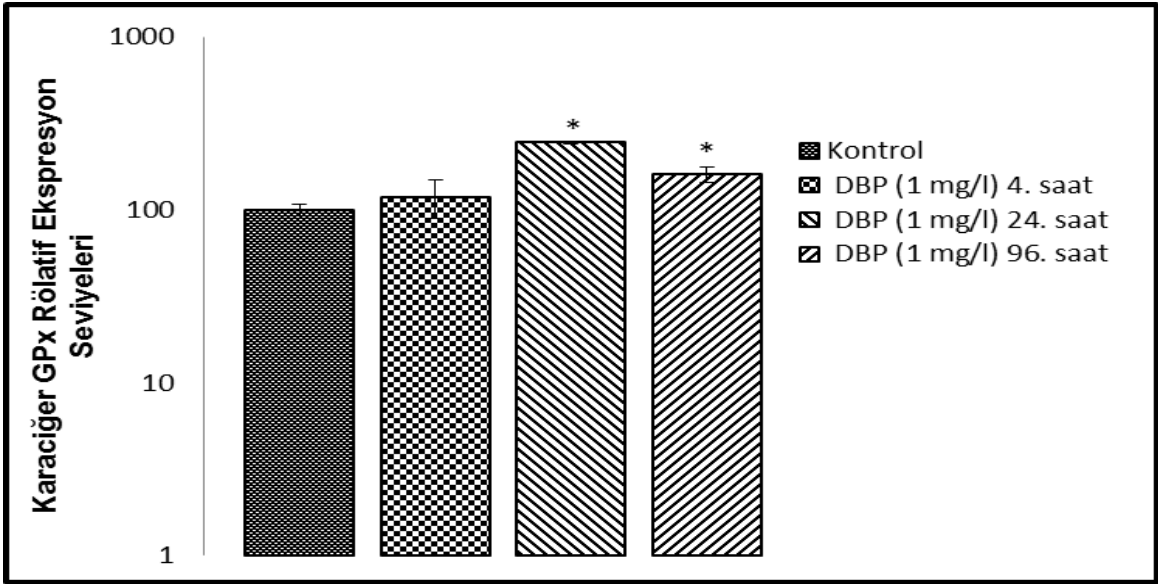
3.2.6 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak GPx Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Kontrol grubu solungaçlarında 4. saatte GPx mRNA seviyeleri $0,0952 \pm 0,0065$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda GPx mRNA seviyeleri $0,089 \pm 0,0032$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 24. saatte GPx mRNA seviyelerinin $0,0837 \pm 0,0046$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olduğu bulunurken, 24. saatte DBP deney grubunda GPx mRNA seviyeleri $0,0983 \pm 0,0085$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=7) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 96. saatte GPx mRNA seviyeleri $0,099 \pm 0,0133$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=5) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP doz grubunda GPx mRNA seviyeleri $0,1248 \pm 0,0077$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) bulunmuştur. DBP muamelesi sonucu 4., 24. ve 96. saatlerde GPx mRNA seviyelerinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede değişimler gözlenmemiştir ($p>0,05$). Şekil 3.12'de solungaç GPx mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.

Kontrol grubu karaciğer dokularında 4. saatte GPx mRNA seviyeleri $2,596 \pm 0,2186$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda GPx mRNA seviyeleri $3,071 \pm 0,7756$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte GPx mRNA seviyeleri $0,998 \pm 0,1345$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6), 24. saatte DBP deney grubunda GPx mRNA seviyeleri $2,446 \pm 0,0532$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte GPx mRNA seviyeleri $1,155 \pm 0,2680$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda GPx mRNA seviyeleri $1,844 \pm 0,1857$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=8) bulunmuştur. Kontrol grubuna göre DBP deney grubunda 4. saatte GPx mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmezken ($p>0,05$), 24. saatte kontrol grubuna göre DBP deney grubunda GPx mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselme gözlenmiştir (2,45 kat, $p<0,05$). DBP doz grubunda 96. saatte kontrol grubuna göre gözlenen artış (1,59 kat) istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Şekil 3.13'de karaciğer GPx mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.12 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında solungaç GPx gen ekspresyonu. GPx ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

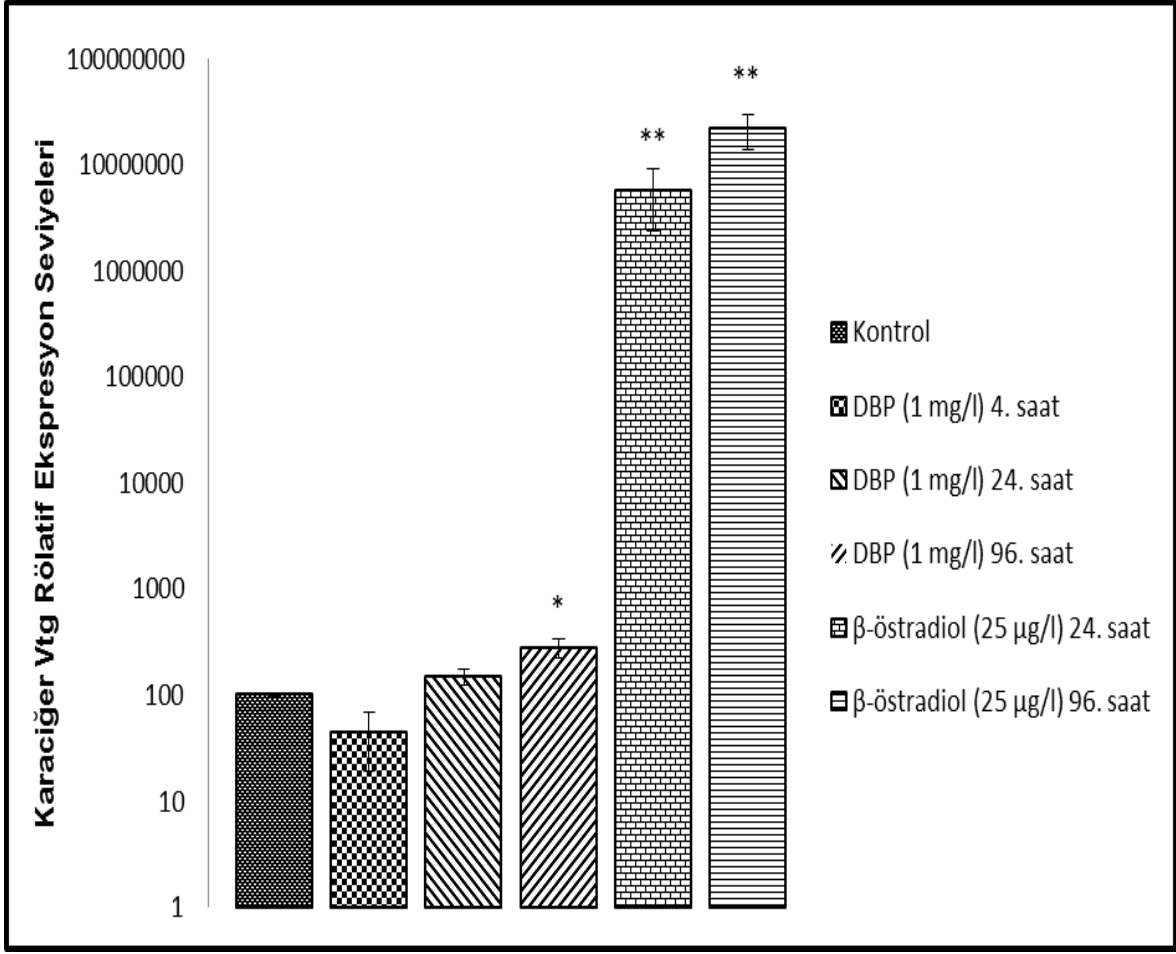


Şekil 3.13 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında karaciğer GPx gen ekspresyonu. GPx ve β -aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmik olarak ifade edilmiştir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

3.2.7 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Vtg Gen Ekspresyonu Üzerine Etkileri

Karaciğer dokularında 4. saatte kontrol grubu Vtg mRNA seviyeleri $2,696 \pm 1,018$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Vtg mRNA seviyeleri $1,1852 \pm 0,6759$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=4) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte Vtg mRNA seviyeleri $0,0016 \pm 0,0003$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6), DBP deney grubunda Vtg mRNA seviyeleri $0,0025 \pm 0,0004$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) ve β -östradiol (pozitif kontrol) doz grubunda Vtg mRNA seviyeleri $95,06 \pm 55,33$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=2) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte Vtg mRNA seviyeleri $0,0020 \pm 0,0004$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=6) olarak hesaplanırken, 96. saat DBP deney grubunda Vtg mRNA seviyeleri $0,0056 \pm 0,0011$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=8) ve β -östradiol (pozitif kontrol) doz grubunda Vtg mRNA seviyeleri $431,5 \pm 153,9$ (ort. eksp. oranı \pm std. hata, n=2) olarak gözlenmiştir. Kontrol grubuna göre DBP deney grubunda 4. ve 24. saatte Vtg mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmezken ($p>0,05$), 96. saatte kontrol grubuna göre DBP deney grubu Vtg mRNA seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselme gözlenmiştir (2,8 kat, $p<0,05$). Pozitif kontrollerde 24. ve 96. saatlerde sırasıyla $5,7 \times 10^6$ ve $2,1 \times 10^7$ kat artış gözlenmiştir. Şekil 3.14'de karaciğer Vtg mRNA seviyelerinin real-time PCR sonuçları verilmiştir.



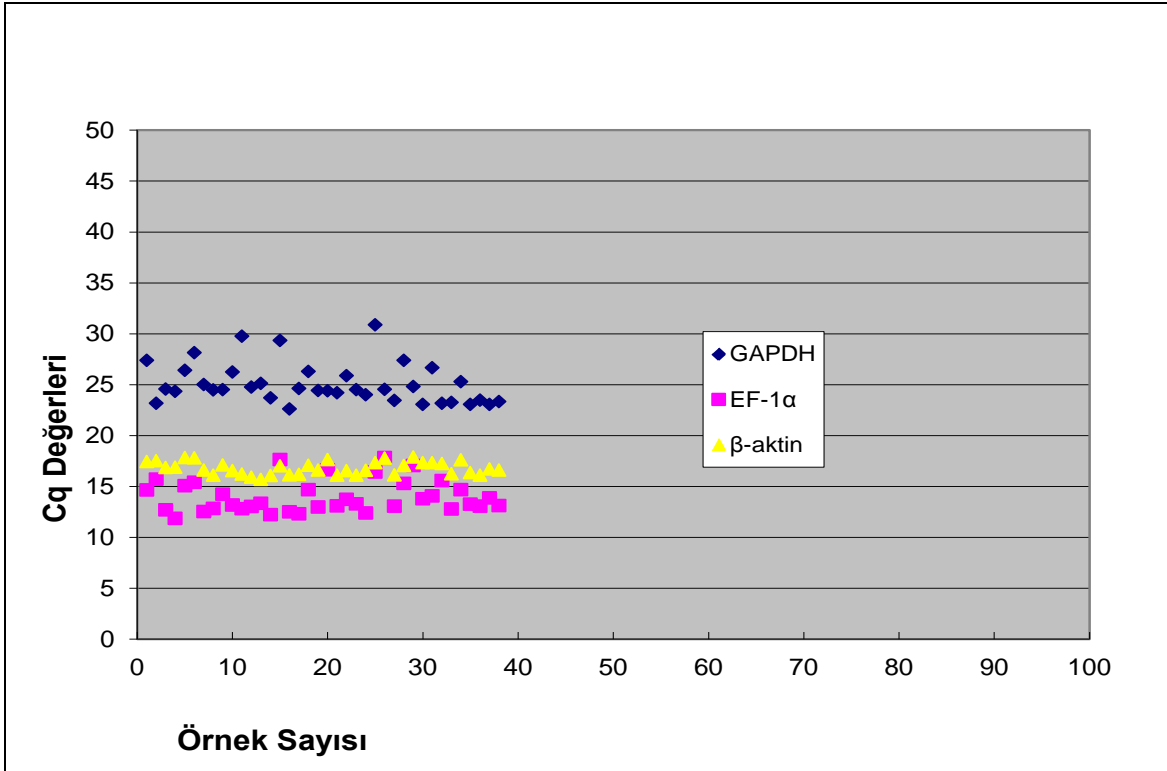
Şekil 3.14 Kontrol grubuna göre normalize edilmiş 4. 24. ve 96. saat deney gruplarında ve pozitif kontrol β-östradiol gruplarında karaciğer Vtg gen ekspresyonu. Vtg ve β-aktin real-time PCR reaksiyonu için 100'er ng cDNA kullanılmıştır. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

**İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,0001$

3.2.8 Real-Time PCR Yöntemi İçin Referans Genin Seçilmesi

Real-time PCR yöntemiyle gen ekspresyon analizlerinde başvurulan aday referans genlerden GAPDH, EF-1 α ve β -aktin denenmiştir. “BestKeeper©-ver.1” programına girilerek CV (coefficient of variation: varyasyon sabiti) çıktıları hesaplanmış ve sonuçlar grafikte gösterilmiştir. Buna göre en küçük CV değeri β -aktin geni olarak bulunmuştur. Referans genlerden GAPDH, EF-1 α ve β -aktin için hesaplanan CV değerleri sırasıyla 0,032, 0,027 ve 0,015’dir. Bir referans genin CV değeri ne kadar küçük bir değer ise, genin farklı bireylerdeki ekspresyon miktarları arasındaki varyasyon (farklılık) da o derece küçüktür. Şekil 3.15’de üç farklı referans genin Cq değerleri grafik ile gösterilmiştir.



Şekil 3.15 Referans genlerden GAPDH, EF-1 α ve β -aktin için real-time PCR ile ölçülen Cq değerleri. Grafikte en sabit ekspresyonun β -aktin ekspresyonu olduğu görülmektedir.

3.3 Protein Seviyelerinin Western Blot Analiziyle Belirlenmesi

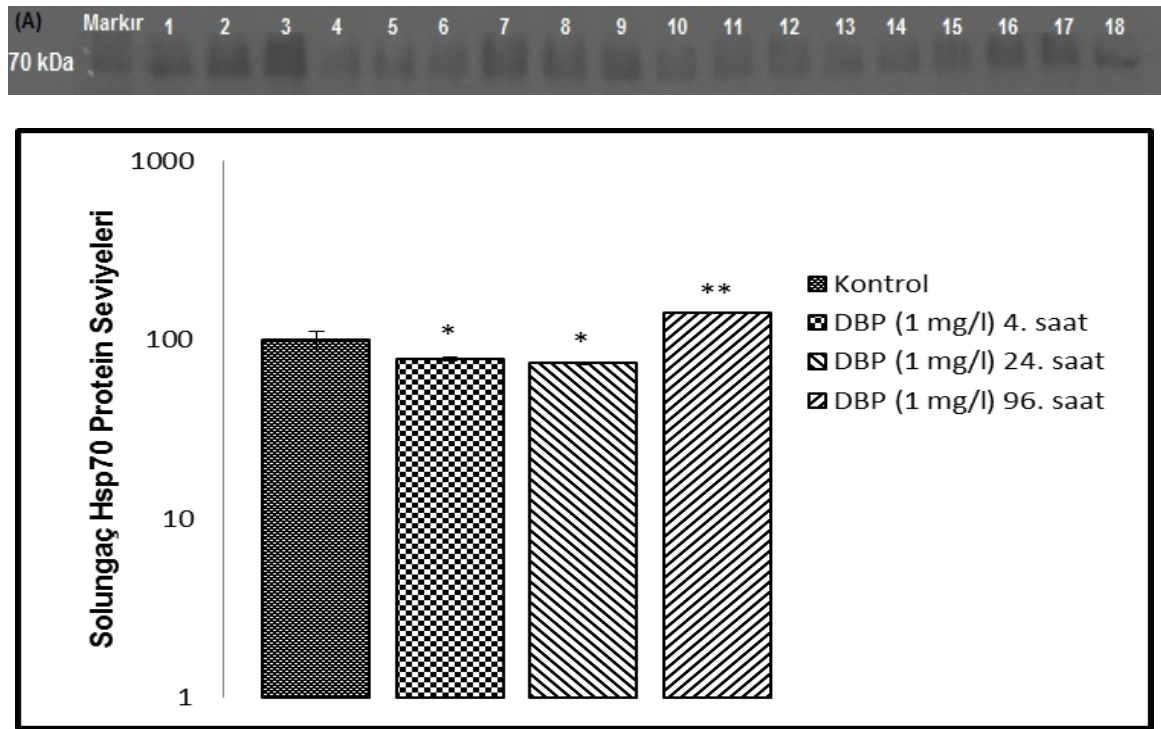
Deney grubundaki (DBP, 1 mg/l) sazan balıklarının solungaç ve karaciğer dokularında Hsp70, CYP1A ve Vtg protein seviyelerinde, kontrol grubuna göre zamana bağlı değişimler western blotlama metoduyla analiz edilmiştir. Primer antikor olarak farede (kültürde) üretilmiş monoklonal anti-Hsp70, monoklonal anti-CYP1A ve monoklonal anti-Vtg kullanılmıştır. Sekonder antikor olarak anti-fare sekonder antikor-alkalen fosfataz konjugatı kullanılmıştır. Protein seviyeleri yaklaşık değerler olarak hesaplanmıştır. SOD ve GPx için antikor temin edilemediğinden western blot analizi yapılamamıştır.

3.3.1 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Hsp70 Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

Anti-Hsp70 antikor (fare monoklonal, Cayman Chemical, Kat: 10011421) 1:500 seyreltilerek, anti-fare sekonder antikor-alkalen fosfataz konjugatı (keçi poliklonal, Sigma, Kat: A3562) ise 1:4000 seyreltilerek uygulanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 4. saatte Hsp70 protein seviyeleri 10900 ± 1320 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Hsp70 protein seviyeleri 8540 ± 263 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 24. saatte Hsp70 protein seviyelerinin 11600 ± 458 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olduğu bulunurken, 24. saatte DBP deney grubunda Hsp70 protein seviyeleri 8590 ± 96 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 96. saatte Hsp70 protein seviyeleri 9353 ± 267 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda Hsp70 protein seviyeleri 13290 ± 172 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) bulunmuştur. DBP muamelesi sonucu 4. ve 24. saatlerde Hsp70 protein seviyelerinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma (1,27 kat ve 1,35 kat) gözlenmiş ($p < 0,05$), 96. saatte ise DBP deney grubu protein seviyeleri 1,42 kata kadar artmıştır ($p < 0,001$). Şekil 3.16'da solungaç Hsp70'in western blot sonuçları gösterilmiştir.

Karaciğer dokularında 4. saatte kontrol grubu Hsp70 protein seviyeleri 4923 ± 930 (ort. pik. alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Hsp70 protein seviyeleri 4777 ± 820 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte Hsp70 protein seviyeleri 3315 ± 137 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3), 24. saatte DBP doz grubunda Hsp70 protein seviyeleri

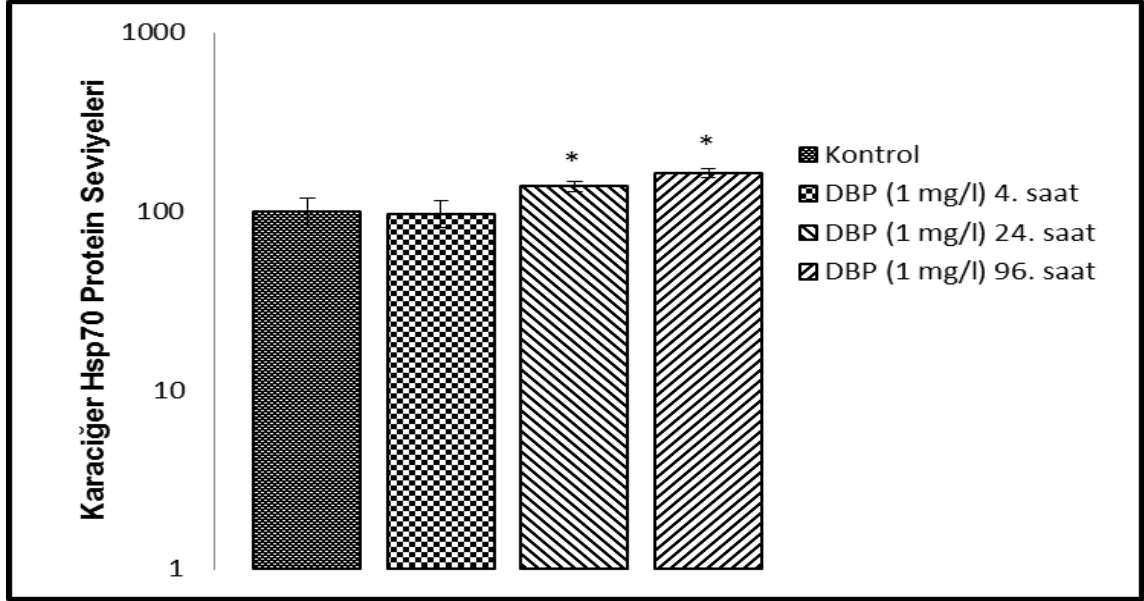
4556 ± 323 (ort. pik alanı ± std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte Hsp70 protein seviyeleri 3075 ± 296 (ort. pik alanı ± std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda Hsp70 protein seviyeleri 5039 ± 294 (ort. pik alanı ± std. hata, n=3) bulunmuştur. Kontrol grubuna göre DBP deney grubunda 4. saatte Hsp70 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmezken ($p>0,05$), 24. ve 96. saatte kontrol grubuna göre DBP deney grubu Hsp70 protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselme gözlenmiştir (1,37 kat ve 1,63 kat, $p<0,05$). Şekil 3.17'de karaciğer Hsp70'in western blot sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.16 DBP'nin sazan balığı solungaç dokusunda Hsp70 protein seviyelerine etkisi. (A) Western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 4. saat kontrol grubu, 4-6: 4. saat DBP deney grubu, 7-9: 24. saat kontrol grubu, 10-12: 24. saat DBP deney grubu, 13-15: 96. saat kontrol grubu, 16-18: 96. saat DBP deney grubu. (B) Solungaç dokularında Hsp70 protein seviyeleri. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmikdir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p<0,05$

**İstatistiksel olarak anlamlı değer $p<0,001$



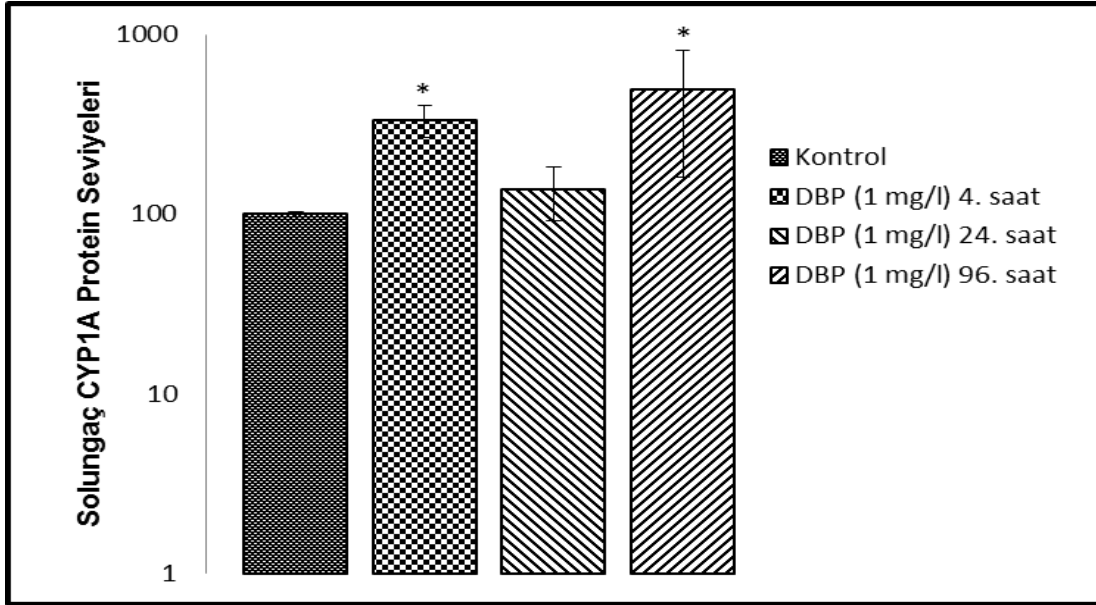
Şekil 3.17 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda Hsp70 protein seviyelerine etkisi. (A) Western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 4. saat kontrol grubu, 4-6: 4. saat DBP deney grubu, 7-9: 24. saat kontrol grubu, 10-12: 24. saat DBP deney grubu, 13-15: 96. saat kontrol grubu, 16-18: 96. saat DBP deney grubu. (B) Karaciğer dokularında Hsp70 protein seviyeleri. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, deney grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

3.3.2 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Solungaç ve Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak CYP1A Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

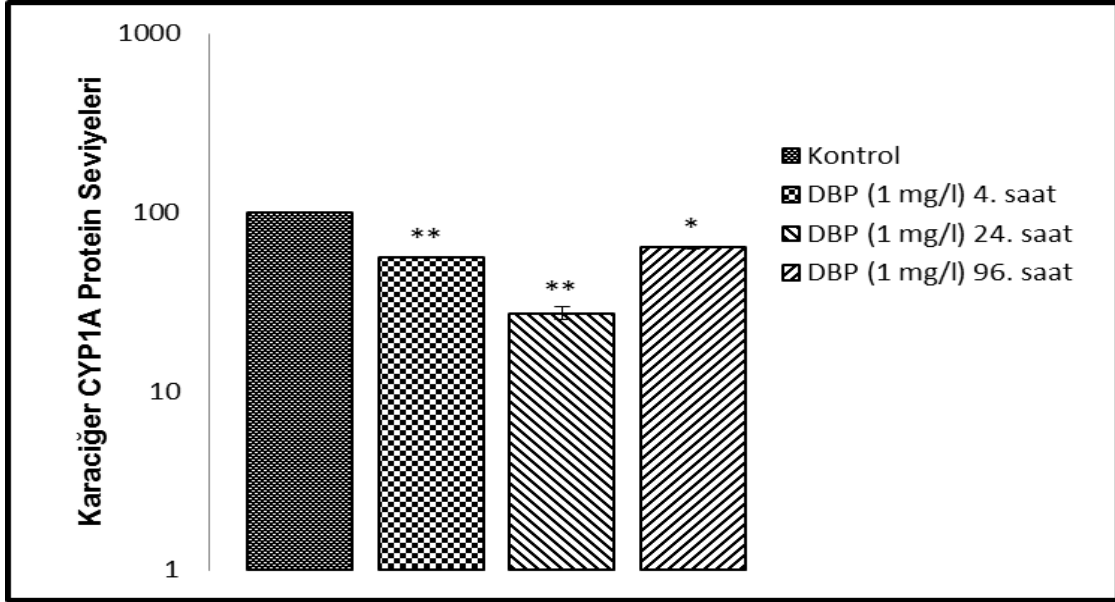
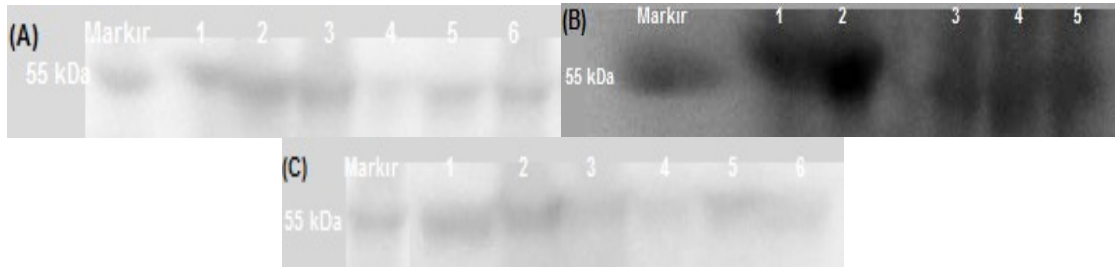
Anti-CYP1A antikoru (fare monoklonal, Cayman Chemical, Kat: 173132) 1:1000 seyreltilerek, anti-fare sekonder antikor-alkalen fosfataz konjugatı (keçi poliklonal, Sigma, Kat: A3562) ise 1:4000 seyreltilerek uygulanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 4. saatte CYP1A protein seviyeleri 4357 ± 127 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri 14590 ± 2878 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 24. saatte CYP1A protein seviyelerinin 4562 ± 1780 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olduğu bulunurken, 24. saat DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri 6271 ± 2103 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu solungaçlarında 96. saatte CYP1A protein seviyeleri 1819 ± 638 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri 8931 ± 6016 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) bulunmuştur. DBP muamelesi sonucu solungaçlarda 4. saatte CYP1A protein seviyelerinde kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış (3,34 kat) gözlenmiş ($p < 0,05$), 24. saatte kontrol seviyelerine geri dönüş olmuş, ancak 96. saatte DBP deney grubunda protein seviyeleri 4,91 kata kadar artmıştır ($p < 0,05$). Şekil 3.18'de solungaç dokusunda CYP1A'nın western blot sonuçları gösterilmiştir.

Karaciğer dokularında 4. saatte kontrol grubu CYP1A protein seviyeleri $6820 \pm 59,5$ (ort. pik. alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri $3821 \pm 40,5$ (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 24. saatte CYP1A protein seviyeleri 8209 ± 501 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=2), 24. saat DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri 2240 ± 189 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğerlerinde 96. saatte CYP1A protein seviyeleri 7933 ± 452 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, 96. saatte DBP deney grubunda CYP1A protein seviyeleri 5020 ± 85 (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) bulunmuştur. Kontrol grubuna göre DBP deney grubunda 4. saatte CYP1A protein seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken (1,78 kat) ($p < 0,001$), 24. saatte bu inhibisyon 3,66 kat ($p < 0,001$) ve 96. saatte ise 1,58 kat olarak gözlenmiştir ($p < 0,05$). Şekil 3.19'da karaciğer dokusunda CYP1A'nın western blot sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.18 DBP'nin sazan balığı solungaç dokusunda CYP1A protein seviyelerine etkisi. (A) Western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 4. saat kontrol grubu, 4-6: 4. saat DBP deney grubu, 7-9: 24. saat kontrol grubu, 10-12: 24. saat DBP deney grubu, 13-15: 96. saat kontrol grubu, 16-18: 96. saat DBP deney grubu. (B) Solungaç dokularında CYP1A protein seviyeleri. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, doz grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$



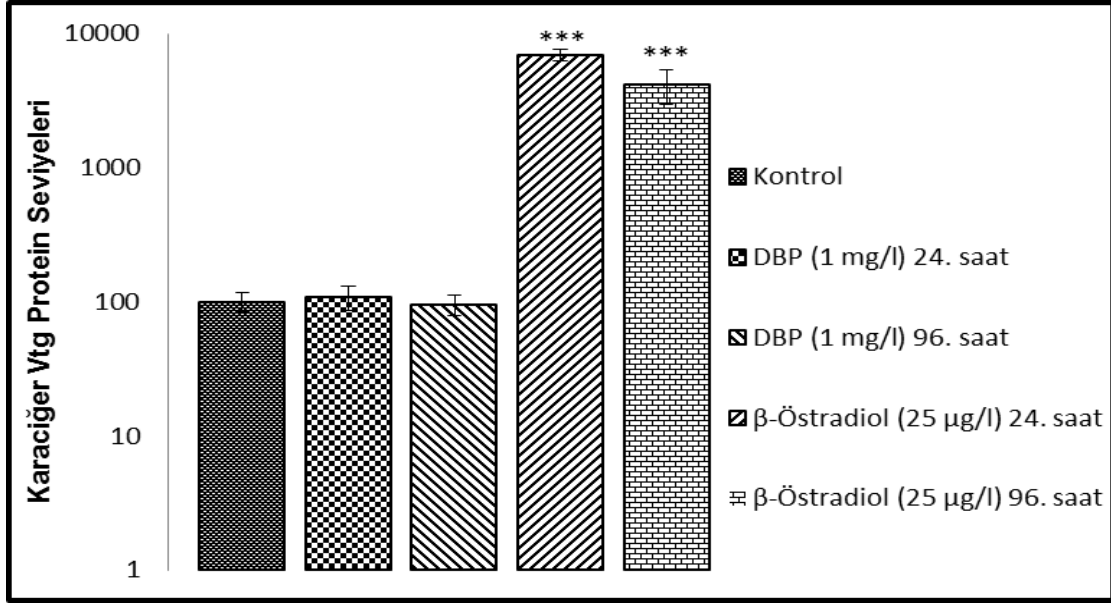
Şekil 3.19 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda CYP1A protein seviyelerine etkisi. (A) 4. saat kontrol ve DBP deney gruplarının western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 4. saat kontrol grubu, 4-6: 4. saat DBP deney grubu. (B) 24. saat kontrol ve DBP deney gruplarının western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-2: 24. saat kontrol grubu, 3-5: 24. saat DBP deney grubu. (C) 96. saat kontrol ve DBP deney gruplarının western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 96. saat kontrol grubu, 4-6: 96. saat DBP deney grubu. (D) Karaciğer dokularında CYP1A protein seviyeleri. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, doz grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmiktir.

*İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,05$

**İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,001$

3.3.3 DBP'nin 4. Saat, 24. Saat ve 96. Saatte Sazan Balıklarının Karaciğer Dokularında Zamana Bağlı Olarak Vtg Protein Seviyeleri Üzerine Etkisi

Anti-Vtg antikoru (fare monoklonal, Cayman Chemical, Kat: 170115) 1:1000 seyreltilerek, anti-fare sekonder antikor-alkalen fosfataz konjugatı (keçi poliklonal, Sigma, Kat: A3562) ise 1:4000 seyreltilerek uygulanmıştır. Karaciğer dokularında 24. saatte kontrol grubu Vtg protein seviyeleri $125 \pm 20,65$ (ort. pik. alanı \pm std. hata, n=3) olarak hesaplanırken, DBP deney grubunda Vtg protein seviyeleri $134 \pm 27,72$ (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3), 24. saatte β -östradiol pozitif kontrol grubunda ise Vtg protein seviyeleri 8581 ± 842 (ort. pik. alanı \pm std. hata, n=2) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubu karaciğer dokularında 96. saatte Vtg protein seviyeleri $83 \pm 13,54$ (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3), 96. saatte DBP deney grubunda Vtg protein seviyeleri $79 \pm 13,87$ (ort. pik alanı \pm std. hata, n=3) ve 96. saatte β -östradiol pozitif kontrol grubunda Vtg protein seviyeleri 3453 ± 1017 (ort. pik. alanı \pm std. hata, n=2) olarak hesaplanmıştır. DBP deney grubunda 24. ve 96. saatlerde kontrollere göre Vtg protein seviyelerinde değişim gözlenmezken, 24. saatte kontrol grubuna göre β -östradiol pozitif kontrol grubunda 686,4 kat ($p<0,0001$), 96. saatte ise 416 kat artış gözlenmiştir ($p<0,0001$). Şekil 3.20'de karaciğer dokularında Vtg'nin western blot sonuçları gösterilmiştir.



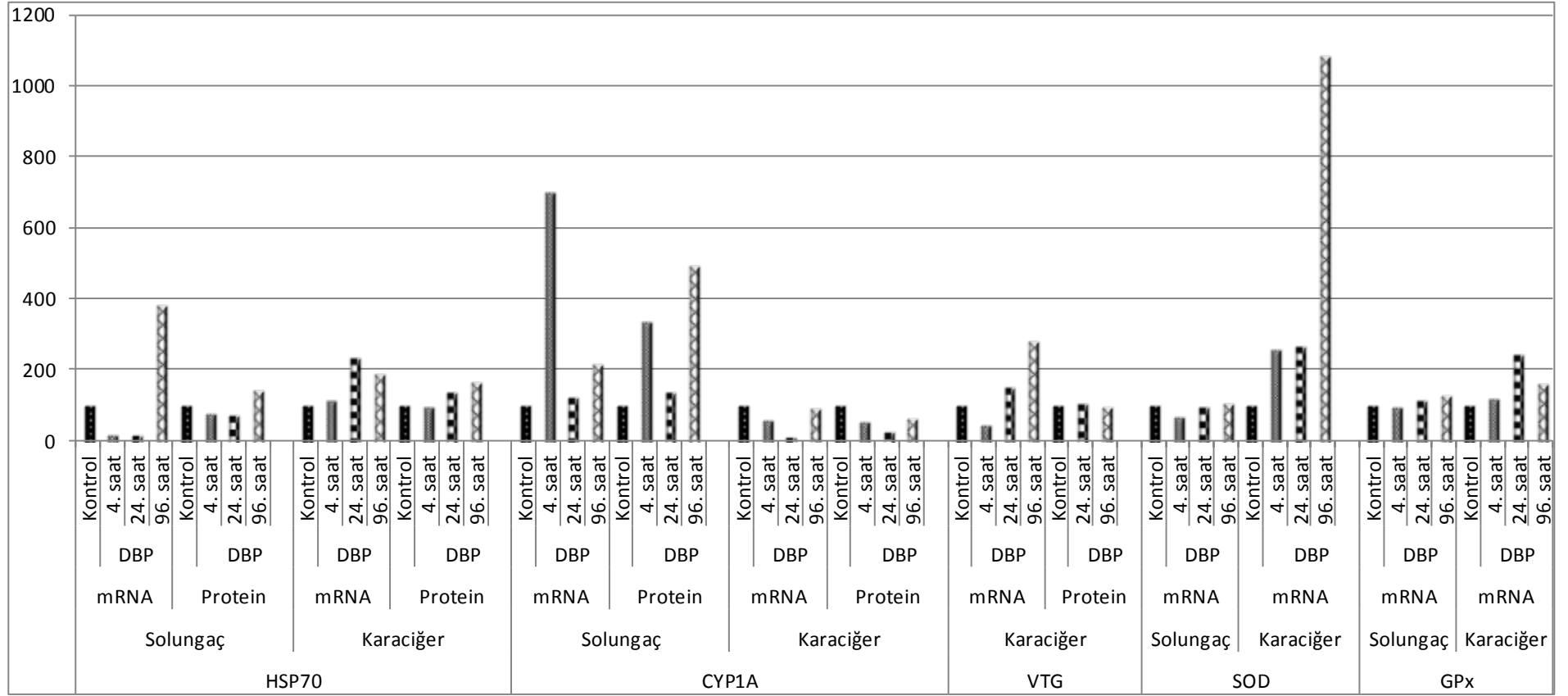
Şekil 3.20 DBP'nin sazan balığı karaciğer dokusunda Vtg protein seviyelerine etkisi. (A) Kontrol ve DBP deney gruplarının 24. saatte western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 24. saat kontrol grubu, 4-6: 24. saat DBP deney grubu. (B) Kontrol ve DBP deney gruplarının 96. saatte western blotlama ile elde edilen protein bantlarının görüntüsü. Markır: Protein molekül ağırlık markırı (10-250 kDa). 1-3: 96. saat kontrol grubu, 4-6: 96. saat DBP deney grubu. (C) Karaciğer dokularında Vtg protein seviyeleri. Kontrollerde hesaplanan değer %100 olarak kabul edilmiş, doz grupları ise kontrol değerinin yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Y-ekseni logaritmandır.

***İstatistiksel olarak anlamlı değer $p < 0,0001$

DBP'nin subletal dozda stres proteinleri Hsp70, CYP1A, SOD, GPx ve endokrin bozucu aday biyobelirteç Vtg'nin mRNA ve protein seviyelerine etkisi Tablo 3.1'de özetlenmiştir. Şekil 3.21'de, model organizma olarak üzerinde çalışmalar yaptığımız sazan balığının DBP maruziyetine karşı belirlenen gen ekspresyon profilinin grafiği verilmiştir. Grafik, incelenen beş genin ekspresyonunun ve protein seviyelerinin karşılıklı olarak incelenmesinde kolaylık sağlayacaktır.

Tablo 3.1 DBP Maruziyeti ile Sazan Balığında (*C. carpio*) mRNA ve Protein Seviyelerinde Rölatif Değişimler

ORGAN		Hsp70 mRNA	Hsp70 Protein	CYP1A mRNA	CYP1A Protein	Vtg mRNA	Vtg Protein	SOD mRNA	GPx mRNA
SOLUNGAÇ	Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	1,00	1,00
	4. saat	5,17 ↓	1,27 ↓	7 ↑	3,34 ↑	-	-	1,5 ↓	1,07 ↓
	24. saat	5,4 ↓	1,35 ↓	1,22 ↑	1,37 ↑	-	-	1,03 ↓	1,14 ↑
	96. saat	3,83 ↑	1,42 ↑	2,15 ↑	4,9 ↑	-	-	1,06 ↑	1,26 ↑
KARACİĞER	Kontrol	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	4. saat	1,16 ↑	1,03 ↓	1,76 ↓	1,78 ↓	2,27 ↓	-	2,58 ↑	1,18 ↑
	24. saat	2,35 ↑	1,37 ↑	8,46 ↓	3,66 ↓	1,56 ↑	1,07 ↑	2,67 ↑	2,45 ↑
	96. saat	1,85 ↑	1,63 ↑	1,08 ↓	1,58 ↓	2,8 ↑	1,05 ↓	10,82 ↑	1,6 ↑



Şekil 3.21 Sazan Balığında (*C. carpio*) Sublethal DBP Maruziyeti ile Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD ve GPx'in Zamana Bağımlı Ekspresyon Profilleri. Protein seviyeleri, karşılaştırma kolaylığı bakımından her bir genin ekspresyon aralığını gösteren alanın sağındaki alanlarda verilmiştir. Y eksenini normalize edilmiş ekspresyon değerlerini göstermektedir.

3.4 Tartışma

Di-n-bütıl fıtalat kozmetik sanayiinde, plastik malzemesi olarak ve polimerlerin yapısında sağlamlaştırıcı ve esnekleştirici madde olarak, boya ve vernik üretiminde, oyuncakların yapısında ve birçok alanda yaygın organik çözücü olarak kullanılmaktadır [1], [2], [6]. Ancak polimerlere kimyasal olarak bağlanmadığından çevreye kirletici olarak salınımı son derece yüksektir ve doğal yaşamı olduğu kadar insan sağlığını da tehdit etmektedir. Fıtalatların birçokunun karsinogenik ve mutajenik etkiye sahip olduğu, bunun yanında endokrin bozucu kimyasallar (EDC) olarak değerlendirildikleri ve hayvan türlerinde antiandrojenik etki oluşturdukları belgelenmiştir [9], [17]. DBP ince bağırsaktan absorbe edildikten hemen sonra hızlıca MBP'ye hidrolize olmakta ve glukuronid bileşikleri halinde idrarla vücut dışına atılmaktadır. DBP'nin 7 günde idrarla vücut dışına atılan miktarı yalnızca %60'dır [29]. Bu bilgi bize DBP'nin organizmada biriktiği ve canlıda kronik toksisiteye ve metabolik bozukluklara sebebiyet verebileceğini işâret etmektedir.

DBP'nin sucul organizmalarda biyoakümülyasyona sebep olduğu uzun süredir bilinmektedir [70]-[72]. Sazan balıklarında (*C. carpio*) DBP'nin biyokonsantrasyon faktörü (BCF) 1,8 kg/l olarak belirlenmiştir [5]. Bunun yanında, sucul canlılar üzerindeki toksik etkileri de raporlara girmiştir [8]. Fıtalatlar veya metabolitleri östrojen reseptörü, aril hidrokarbon reseptörü ve androjen reseptörüyle etkileşim göstererek endokrin bozucu ve oksidatif stres etkisi göstermektedirler. DBP ve çevre kirleticisi diğer fıtalatların sucul organizmalardaki etkileri üzerine çok fazla çalışma olmasına rağmen [74], [77], [84], etki mekanizması henüz çok tartışmalıdır ve kesin değildir. Ancak bir kimyasalın organizma üzerinde yarattığı toksik etki ve stres canlının bütünüyle değerlendirildiği ve anatomik, fizyolojik, patolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerin araştırıldığı tümdengelimci bir yaklaşım sergilenmelidir. Bilim ve teknolojidaki gelişmeler araştırmacılara farklı metodlarla ve karşılaştırmalı olarak çalışma imkanı sağlamaktadır. Toksik etki mekanizmalarının araştırılmasında, bu yüzyıla kadar enzim aktivitesi, protein seviyeleri, biyomoleküllerin oksitlenme düzeyi gibi metotlar çokça kullanılmışsa da, toksikolojik mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için transkripsiyon öncesi, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası seviyelerin aydınlatılması büyük önem arz etmektedir. Örneğin, DBP'nin fareler üzerinde uterin (dölyatağı) Hsp70 seviyelerinde azalmaya neden olduğu bilinmekte [138] ve bunun yanında lipid

metabolizmasında da değişimlere sebebiyet verdiği bilinmektedir [53]. Bununla birlikte, östrojen reseptörü- α 'nın promotor bölgesinde sebep olduğu hipometilasyonla östrojen sentezini arttırıcı etkisi olduğu ortaya çıkarılmış olmakla birlikte [59], DBP'nin östradiol etkisiyle benzer bir etkiye sahip olduğu ve ısı şoku proteininin ekspresyonu üzerinde östradiolle korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir [50]. DBP'nin oksidatif stres ve hasara sebep olduğu bildirilmiştir [246]. Oksidatif stres ile ortaya çıkan süperoksit anyonları ve oksijen radikalleri hücrede birikerek proteotoksisitenin ve protein agregatlarının oluşmasını teşvik eder. Kimyasal ve oksidatif stres sonucu sitotoksisite ve protein agregasyonu ile başa çıkmak için hücrede artan Hsp70 konsantrasyonları, MS (Multiple Sclerosis), Alzheimer ve Parkinson hastalıkları üzerine yapılan çalışmalarda önemli yer tutmaktadır [247]. Beyinde normalde Hsp70 konsantrasyonu, Hsc70 konsantrasyonuna göre çok daha azdır, ancak Hsc70 tauopatilerin klerensinde Hsp70'e göre daha az başarılıdır [248]. Artan yaşla birlikte organizmada biriken oksidatif stres ürünleri proteotoksisiteyi arttırmaktadır. Hsp70-Hsp110 protein katlanmasında ve degradasyonun önlenmesinde önemli biyolojik şaperonlardır. Reaktif oksijen türleri proteotoksisiteye ve bu yolla da ısı şoku proteinlerinin ekspresyonunda indüklenmeye sebep oluyorsa, fitalatların organizmada teşvik ettikleri stres de ısı şoku proteinlerinin artmasına sebep olabilir. Oksidatif strese neden olan bazı hidrokarbonlar sitokrom P450 enzimlerinin de substratlarıdır ve P450'ler hidrokarbon reseptörleri aracılığıyla substrat bağımlı olarak indüklenebilirler. Bir kimyasal ajan organizmada pek çok farklı metabolik etkiye sahip olabilir. Fitalatlar söz konusu olduğunda, oksidatif stresin, östrojen sentezinin, lipid metabolizmasının, apoptozun arttığı bilinmekle birlikte, söz konusu biyolojik süreçlerde kimyasal ajanın dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak şaperonların sentezinde, östrojen sentezinde, P450 sentezinde ve oksidatif stresle başa çıkmada görevli SOD ve GPx gibi evrensel temizleyici proteinlerin sentezinde regölasyonel değişimlere neden olabileceği düşünülebilir [50] [251]-[254].

Strese karşı yanıtta etki mekanizması sanılandan daha karmaşıktır. Arilhidrokarbon reseptörü CYP1A'nın sentezinden sorumlu transaktive edici olmasına rağmen, östrojen reseptörü- α ile aralarında karmaşık bir ilişki vardır. β -östradiol maruziyeti ile CYP1A transkripsiyonun baskılandığı, ancak ER α antagonisti varlığında bu baskılanmanın ortadan kalktığı bilinmektedir [176]. AhR-

ligand kompleksi de E2-ER α kompleksini modüle ederek aktif ER α 'nın DNA bağlanma kapasitesini azaltmaktadır [177]. Öne sürülen hipoteze göre, AhR-agonist aracılı antiöstrojenik etkiyle, nükleer AhR-Arnt kompleksi ER α 'yı AhR-yanıtı aracılı gen promotorlarına yönlendirerek östrojen yanıtı genlerinin transkripsiyonu engellenmekte ve bu işlem proteozom kompleksi, ubikuitinasyon ve degradasyonla koordine yürütülmektedir [178], [179]. Bunun yanında, AhR sinyalinin nonilfenol gibi östrojeni taklit eden bir ajan ile bastırılarak CYP1A indüksiyonunun baskılandığı [185], buna karşın indüklenmiş CYP1A aktivitesine paralel olarak vitellogenin üretiminin de baskılandığı bildirilmiştir [178]. Çalışmamızda, DBP deney grubunda Vtg mRNA seviyelerinde zamana bağlı olarak dalgalanma gözlenmiş, fakat protein seviyelerinde değişiklik tespit edilmemiştir. Vtg sentezinde indüklenme tespit edilmemiş olması, DBP'nin akut EDC aktivitesi olmadığını göstermektedir. Western blotlama sonuçları gerçeğe yakın sonuçlar olmasına rağmen, elde edilen sonuçlar yaklaşık değerlerdir ve küçük miktar değişimlerinin tespit edilmesinde kesin değerlerden bahsetmek olanaklı değildir. Ayrıca mRNA stabilizasyonunu etkileyen herhangi bir faktör, mRNA seviyesinde indüklenmenin protein seviyesinde karşılık bulamamasına neden olabilir.

Bu çalışmada, DBP'nin oksidatif metabolizmaya etkisini anlamak için süperoksit dismutaz ve GPx enzimlerinin ekspresyon düzeyinde seviyeleri real-time PCR metodu ile belirlenmiştir. Bunun yanında, oksidatif stres mekanizmasının faz I enzimlerinden CYP1A'nın regülasyonundaki değişimin, faz II sistemindeki konjugasyon enzimlerinin ve temizleyicilerin ekspresyonundaki değişimlerle paralellik göstermesi beklenebilir. Bu çalışmada faz I enzimlerinden CYP1A'nın mRNA ve protein seviyeleri düzeyinde ekspresyonu çalışılmıştır. Oksidatif stres sonucu proteotoksisitedeki artışın şaperonların indüklenbilir formlarından Hsp70'in ekspresyonunu arttırabileceği düşünülebilir. Ancak homeostaz sağlandıktan sonra hücrede birikmiş fazla şaperonlar Hsp70 transkripsiyonunun regülasyonunu negatif yönde etkileyebilir. Sazan balığında oksidatif stresin solungaç, karaciğer ve kalpte erken faz Hsp70 ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir [127]-[129]. AhR agonistlerinden β -naftaflavon Hsp70 seviyelerinde artışa sebep olsa da [114], AhR agonisti ve apoptoz indükleyicisi dimetilbenz[a]antrasen Hsp70 seviyelerinde azalmayı teşvik etmektedir [118].

Ancak zebra balığında (*D. rerio*) Hsp70'in anti-apoptotik etkisi ortaya konulmuştur [124], [125]. Vitellogenin sentezinin transaktivasyonundan sorumlu ER α agonisti β -östradiol ile muamelede Hsp70 mRNA seviyelerinde azalma gözlemlendiği bildirilmiştir. DBP'nin, model organizma olarak seçilen sazan balığında *in vivo* etkilerinin anlaşılması, aksiyon mekanizmasının anlaşılması için gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarla ortaya konulan sınırlı bilgiler için tamamlayıcılık teşkil edecektir. Organizmanın bütününe kapsayan bir regülasyondan söz etmek için transking bifonksiyonel reseptörleri, homeostazi ve hormonal regülasyonu da (hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninde yanıt mekanizması) kapsayan ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, toksisitesi bazı model organizmalarda araştırılmış DBP kimyasal maddesinin model organizma sazan balığının metabolizmasında oluşan stres yanıtı ve toksisitenin daha iyi anlaşılabilmesi ve sucul yaşam alanlarını kirleten kontaminanlar hakkında bilgi sahibi olunabilmesi amacıyla aday biyobelirteç proteinlerin belirlenmesi hedeflenmiştir. Solungaç Hsp70 mRNA ekspresyonunda DBP maruziyeti (1 mg/l) sonucu ilk 4 saatte 5,17 kat inhibisyon gözlenmiştir. Bu inhibisyon 24 içinde 5,4 kat olmuştur. Ancak 96. saatte normal seviyelerin 3,83 katına kadar mRNA seviyeleri artmıştır. Bununla birlikte, 4. saat ve 24. saatte benzer bir azalma protein seviyelerinde de tespit edilmiştir ve mRNA seviyeleriyle korelasyon göstermiştir. Solungaçlar sucul ortamla balık arasındaki bir arayüzdür ve su içerisinde çözülmüş ajanlarla doğrudan temas halindedir. Toksik etki veya yaralanma oluşturma kapasitesine sahip bir kimyasal madde ile temas halinde, bununla başa çıkmak için yangı mekanizmasında bir yandan dokuda tamir mekanizmaları indüklenirken, bir yandan da hücredeki protein ve lipit oksidasyon ve agregasyonlarını engellemek için şaperonlar ilk yanıt olarak devreye girerler. Şaperonlardan Hsp70, strese karşı ilk yanıtta devreye giren, intronsuz, kısa sürede ekspresyona uğrayıp sentezlenen, fakat normal fizyolojik koşullarda tespit edilme sınırında bulunan bir stres yanıt proteinidir. DBP'nin toksisitesi sonucu maruziyetin ilk saatlerinde Hsp70'in, sitozolik heterodimer kompleksi eşleniği Hsp90'ın ve nükleer eksport adaptörü Thoc5'in ekspresyonu ve bununla birlikte protein seviyelerinde oluşan bir artış, hücrede sitozolik şaperonların birikmesine, nükleusta ise eksport adaptörlerinin tükenmesine neden olmuş olabilir. DBP'nin ölümle sonuçlanmayan bu etkilerinin arkasında, DBP'nin ve diğer zararlı ajanların

olumsuz etkilerini tolere etmeye evrimleşmiş bir mekanizmadan söz edilebilir. Strese karşı yanıt mekanizmasının anlaşılmasına yönelik ileri çalışmalar, DBP kaynaklı strese karşı tetiklenen stres yanıtının anlaşılmasını sağlayacaktır.

Solungaçlarda CYP1A mRNA seviyelerinde ölçtüğümüz 4. saatte 7 katlık, 24. saatte 1,22 katlık ve 96. saatte 2,15 katlık artış, DBP'nin substrat olarak doğrudan veya teşvik ettiği sitotoksik mekanizmalarla dolaylı yoldan CYP1A enziminin sentezini indüklediğine işâret etmektedir. Solungaç CYP1A protein seviyelerinde de benzer artışlar gözlenmiştir (4. saat 3,34 kat, 24. saatte 1,37 kat ve 96. saatte 4,9 kat artış). Bu durumda, substratıyla (ya da AhR'nin ligandıyla) indüklenebilen CYP1A sentezindeki bu katlı artış, DBP'nin ve hızlı metabolizma ürünü MBP'nin CYP1A aracılıklı monooksijenasyonu ve dolaylı olarak oksidatif stres mekanizmalarını teşvik edebileceği söylenebilir. Oksidatif stres, kimyasal stresin ilk saatlerinde ortaya çıkmış ise, stres sonucu başlayan protein denatürasyonu başa çıkmak ve hatta apoptozu engellemek için miktarı logaritmik düzeyde artan şaperonlar ve Hsp70, Hsp70'in sitozolde inaktif formdayken bağlı bulunduğu ve aynı zamanda Hsp70'in transaktive edici faktörü HSF1'in, konsantrasyon bağımlı olarak serbest formunun tükenmesi ile, bu heterodimerden ayrılıp nükleusa translokasyonu gerçekleşmemiş ve Hsp70 gen ekspresyonunu başlatamamış olabilir. Sonuçta Hsp70 mRNA transkripsiyonunda azalma ve inhibisyon ortaya çıkmış olabilir. AhR agonisti bazı maddelere maruziyet sonucu Hsp70 seviyelerinin düştüğü daha önce rapor edilmiştir [118]. Bunun yanında, kimyasal ajanlara akut maruziyet sonucu organizmada oluşan oksidatif stresin Hsp70'in ekspresyon seviyelerinde azalmaya sebep olduğu, ancak ekspresyondaki değişimlerin düzenlilik göstermediği bildirilmiştir [126]. Buna zıt olarak, bazı çalışmalarda oksidatif stresin, oksijen radikallerinin ve süperoksit anyonlarının erken faz Hsp70'in ve diğer şaperonların ekspresyonunu indükleyebildiği tespit edilmiştir [127]-[129], [247]. Bütün bu veriler Hsp70 ekspresyonunun regülasyonuna ilişkin karmaşık ilişkiyi anlamada araştırmacılara literatür kaynağı sağlamaktadır.

Oksidatif stresin diğer biyobelirteçlerinden ve faz II sisteminin, konjugasyon yaparak reaktif hidroksillerin temizlenmesini ve atılımını kolaylaştıran SOD ve GPx proteinlerinin mRNA seviyeleri real-time PCR metoduyla incelenmiştir. Solungaç dokusunda SOD ve GPx mRNA seviyelerinde kontrollere göre değişim gözlenmemiştir. Cyprinidae familyasındaki türler arasında oksidatif ajanlara karşı

en yüksek SOD aktivitesi *C. carpio*'da tespit edilmiştir, ancak SOD ve GPx aktivitesi solungaçlarda lipid peroksidasyonunu engellemede başarısız olmuştur [212]. Bu sonuçlar bize asıl antioksidan metabolizmanın, vücudun metabolizmadan sorumlu en önemli organı karaciğeri işâret etmektedir. Bulgularımıza göre sazan karaciğerinde, DBP muamelesinden sonra SOD ve GPx aktivitesinde ilk saatlerden itibaren (4. saatte sırasıyla 2,58 kat ve 1,18 kat artış) katlı artış gözlenmiş, 24. saatte bu artış iki katına çıkmış, 96. saatte ise sırasıyla 10 kat ve 1,6 kat olarak tespit edilmiştir. Karaciğerde ciddi oksidatif stres belirtisi olarak görülen SOD ve GPx ekspresyonundaki artış önceki çalışmalarla da desteklenmektedir [216]-[220].

Hepatotoksik maddelerle maruziyetin ilk saatlerinde SOD ve GPx aktivitelerinde artış gözlenebilir. Bu artış reaktif oksijen türlerinin birikmesi sonucu SOD ve GPx antioksidan savunma sisteminin indüklenmesi yoluyla olmaktadır [209]. SOD, GPx ve CAT aktivitesindeki artış, toksik radikallerin klerensinde antioksidan sistemin önemini göstermektedir. Karaciğerde gözlediğimiz SOD ve GPx ekspresyonundaki katlı artış, ksenobiyotik ve antioksidan metabolizmanın, periferdeki organlardan ziyade daha çok karaciğerde yoğunlaşmasından kaynaklanıyor olabilir. Solungaçlarda benzer bir artışın görülmemesi, solungaçların ana metabolizma organı olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Ancak solungaçlarda tespit ettiğimiz CYP1A ekspresyonundaki katlı artışın, DBP'nin, geçiş organı olan solungaçlarda sebep olduğu toksisitenin SOD ve GPx ekspresyonunda bir artışa neden olacak kadar yüksek düzeyde olmadığı düşünülebilir. Öte yandan, önceki çalışmalarda önerilen alternatif yollardan da bahsedilebilir. Bunlardan bir tanesi CYP1A ekspresyonunu transaktivasyonla transkripsiyonel düzeyde arttırabilen arilhidrokarbon reseptörünün ligand bağımlı aktivitesinin regülasyonundaki değişimler olabilir [249]. AhR, ligand varlığında CYP1A transkripsiyonunu arttırabilmekte, ancak AhR'nin heterodimer eşleniği Arnt molekülünün AhR represörünün (AhRR) tahakkümü altına girerek, AhR'nin nükleusa translokasyonunu ve CYP1A ekspresyonunda artışı sağlayamadığı, hatta bir miktar azalmaya yol açabileceği bilinmektedir [250].

Subletal DBP dozlaması sonucu CYP1A'nın mRNA seviyesinde ilk 4 saatte hızlı ve anlamlı bir artış göstermesi aril hidrokarbon reseptörleri aracılığıyla ve transkripsiyon seviyesinde kontrol edildiğine dair önemli veriler içermektedir. 24.

saatte etkinin nötralize olması ve ardından 96. saatte seviyelerin tekrar iki kata kadar artmış olması CYP1A'nın solungaçlarda zamana bağımlı ekspresyon profili hakkında bilgi vermektedir. DBP ve diğer fitalat esterlerinin oksidatif strese neden olduğuna dair çalışmalar stres proteinleriyle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir [50]. DBP'nin zebra balığı (*D. rerio*) döllenmiş yumurtalarında peroksizom proliferasyonunu, CYP1A'nın ve aromataz (CYP19A) genlerinin ekspresyonunu indüklediği rapor edilmiştir [251]. Ancak sazan balığı üzerindeki etkileri henüz bilinmemektedir. Balıklarda AhR alt tiplerinin ve bunlarla ilişkili proteinlerin toksikolojik önemi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [185]. AhR geni bakımından knock-out farelerde AhR prototipik agonistlerinin varlığında CYP1A indüksiyonu gözlenmemiştir. Çalışmamızda gözlenen CYP1A indüksiyonunun derecesinde tespit edilen varyasyon AhR ve Arnt polimorfizmine bağlı olabilir [173].

Bu çalışmada stres koşullarına yanıt veren beş proteinin gen ekspresyonu ve protein seviyeleri bakımından incelenmesi gerçekleştirilmiş ve ekspresyon profilleri zamana bağlı olarak sublethal DBP maruziyetine karşı tespit edilmiştir. Şekil 3.19'daki grafiğe göre, DBP maruziyetinden en yüksek düzeyde etkilenen protein karaciğer süperoksit dismutazıdır. Karaciğer SOD mRNA seviyeleri 4. ve 24. saatte yaklaşık 2 kat, 96. saatte ise yaklaşık 11 kat artmıştır. Solungaç CYP1A mRNA seviyeleri ise 4. saatte 7 kat artmış, 24. saatte normal seviyelere yaklaşmış, 96. saatte ise 2,15 kat artmıştır. Buna paralel olarak western blotlama sonuçlarına göre, CYP1A'nın protein seviyeleri mRNA seviyelerine benzer değişim göstermiş ve ekspresyonu doğrulamıştır. Real-time PCR sonuçlarında diğer önemli bir mRNA seviyesi artışı 96. saatte solungaç Hsp70'inde gözlenmiştir. mRNA seviyesindeki 3,83 katlık artış, protein seviyesinde 1,42 katlık bir artışa neden olmuştur. Buna karşın, karaciğer Hsp70 ekspresyonundaki 24. ve 96. saatlerdeki yaklaşık 2 katlık artış, protein seviyelerinde yaklaşık 1,5 katlık artışlarla paralellik göstermektedir. Hsp70'in organ spesifik ekspresyon profili gösterdiği bilinmektedir. Örneğin, memeli beyinde Hsp70 ekspresyonu Hsc70 ekspresyonuna göre karşılaştırılabilir oranda az olmasına rağmen [248], balıkta oksidatif stres koşullarında ekspresyonunun arttığı [131], memeli beyinde protein denatürasyonuna karşı [248] ve domuz blastokistlerinde oksidatif strese karşı

[130] -karaciğerde Hsp70 indüklenmesine rağmen- Hsc70 ekspresyonunun indüklendiği rapor edilmiştir.

Karaciğerde indüklenen Hsp70 ekspresyonu ile karaciğer CYP1A ekspresyonunun regülasyonu paralellik göstermemektedir. Karaciğerde CYP1A ekspresyonunda 1,5-8 kat arasında inhibisyon gözlenirken, protein seviyelerinde de 1,5-3,5 kat azalma gözlenmiştir. SOD ve GPx ekspresyonunda görülen katlı artış, DBP'nin karaciğerde ROS'ların artışına yol açtığına işaret ediyor olsa da, CYP1A'nın karaciğerde inhibisyona uğraması, ROS'ların dışında başka aktörlerin de senaryoya dahil olduğunu düşündürmektedir. Karaciğerde 24. saatte 3,5 kat azalan CYP1A protein seviyesi, 96. saatte normal seviyelere dönmüştür. Buna paralel olarak SOD ve GPx ekspresyonları ise 10 ile 1,6 kat artış göstermiştir. Reaktif oksijen türlerinin, süperoksit anyonlarının ve peroksitlerin hücrede birikmesinin 24. saat ile 96. saat arasında gerçekleşmiş olması ihtimali üzerinde duracak olursak, CYP1A seviyelerinin 96. saatte normale dönmeleri ve SOD-GPx ikilisinin 96. saatte en yüksek düzeye ulaşmalarını anlamamız mümkün olabilir. Solungaçlarda, karaciğere göre daha düşük yoğunlukta metabolik aktivite gerçekleşmesi, DBP'nin solungaçlarda metabolizmaya uğramadığı, ancak AhR, Arnt ve AhRR aracılıklı CYP1A indüksiyonunun söz konusu olabileceği düşünülebilir. DBP'nin MCF-7 ve MCF-10A insan hücre hatlarında ER α promotor bölgesinde DNA hipometilasyonuna yol açtığı [59], dietilhekzil fitalatın sazan balıklarında Vtg sentezini arttırdığı ve fitalatların genel olarak östrojen reseptörü, arilhidrokarbon reseptörü ve androjen reseptörünü etkilediği bilinmektedir [84]. Şayet DBP östrojenik (ya da anti-androjenik) etki gösteriyorsa, bazı durumlarda AhR-ligand kompleksinin östradiol-östrojen reseptörü kompleksini zaptederek östrojen yanıt elementlerine bağlanmasını engellediği modele [177] benzer şekilde ve buna zıt yönde, bu çapraz etkileşimin tersine çalıştırılarak CYP1A ekspresyonunun inhibisyona uğratılmasından bahsedilebilir [176].

Şekil 1.11'de en son bulgulara göre oluşturulan modelde, AhR-ligand bağımlı CYP1A transaktivasyonu modeline alternatif olarak, protein kinazların varlığından bahsedilmiştir [181]. Alternatif modele göre, sinyal transdüksiyonu için AhR ve Arnt'nin treonin rezidüleri üzerinden serin-treonin protein kinazı ile fosforillenmesi gerekmektedir [182]. Örneğin, TCDD'nin CYP1A ekspresyonunu indüklemesinin, MAPK'nın TCDD ile teşvik edilerek, MAPK-AhR bağımlı CYP1A gen

transkripsiyonunun artırılması şeklinde olduğu açıklanmıştır [183]. DBP'nin, protein kinazlarla etkileştiği, protein kinazların aktivitesini ve fosforillenmeyi arttırdığı bilinmektedir. O halde, DBP AhR-ligand bağımlı olmayan bir yolla CYP1A ekspresyonunu dolaylı olarak indüklemiş olabilir. Memeli hücrelerinde fitalatların ve DBP'nin protein kinazların aktivitesini ve fosforillenmeyi arttırdığı bildirilmiştir [252]–[254]. Bu durumda, solungaçlarda oksidatif stresten bağımsız ya da AhR-ligand bağımlı olmayan yolla CYP1A ekspresyonunun 2-7 kat artırılması, alternatif modele dayanarak, DBP'nin protein kinazların aktivitesini arttırması ve CYP1A'nın AhR-Arnt transaktivasyonu ile vuku bulduğu sonucuna varılabilir.

DBP'nin (1 mg/l) *C. carpio*'da solungaç dokusunda 1-4 gün içerisinde anevrizmalara, lamellar füzyona, epitelyal hiperplaziye, gerilme ve ödem oluşumuna sebebiyet verdiği rapor edilmiştir [255]. Kirliliğe maruz kalan balık solungaçlarında tespit edilen anevrizmalar, lamellar füzyon, hiperplazi ve epitelyal lifting, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresle korelasyon göstermiş [256], ayrıca kirleticilerin doğrudan dejenerasyona, nekroza ve apoptoza yol açtığı bildirilmiştir [257]. Solungaç dokusunda oluşan nekroz ve apoptoza karşı yanıt olarak epitelyal hiperplazi, sekonder lamella gelişimi, filament kalınlaşması gözlemlendiği rapor edilmiştir [258], [259]. DBP muamelesi sonucu sazan balığı solungaçlarında 96. saatte görülen bu histolojik değişimler [255], maruziyetin ilk 24 saati içinde gelişen nekrozların ve apoptozun ortaya çıkmış olabileceğini düşündürse de, bu çalışmada apoptoz ve nekrozlara dair deneyler yapılmamıştır. Bunun yanında, literatürde Hsp70'in nekrozlar ve apoptoza ilişkin "pleiotropik aktörlük" yaptığı bildirilmiştir [260]–[263]. Hsp70'in, hücre hasarına ilişkin bazı durumlarda, hücreyi ölümden kurtarmada geri dönüşü olmayan hasar olgularında ve oksidatif stres koşullarında hücreyi ölüme teşvik ettiği bilinmektedir. Hücre hasarında ve hücrel stres koşullarında Hsp70'ten ziyade Hsp90'ın yetkin olduğu ortaya konulmuştur [264]. Buna ek olarak, oksidatif stres koşullarında Hsp27 nükleusa geçerek DNA'nın bütünlüğünün korunmasında görev almaktadır. Hücrenin enerji yönetim stratejisi doğrultusunda, biyolojik moleküllerin ve enerjinin, Hsp70'den ziyade Hsp90, Hsp27, Hsp105 α gibi daha etkin ve anahtar görevde moleküllerin sentezlenmesine yönlendirildiği ve Hsp70 ekspresyonunun baskılandığı fikrini doğrulayabilir [265]. Sıçan histiyositlerinde yapılan bir çalışmada, reaktif oksijen türleri ile indüklenen hidrojen peroksit oluşumuna karşı Hsc70'in de aktif koruma

sağladığı bildirilmiştir [266]. Geri dönüşsüz hücre hasarında Hsp70'in indüklenmesi gerçekleşmez, hatta HSF-1 baskılanarak Hsp70 transkripsiyonel seviyede inhibisyona uğrayabilir [260]-[267]. Bu inhibisyon HSF-1'in proteazlarca parçalanmasıyla uzun sürelerle de yayılabilir [268]. Tatlı su balıklarından kanal kedi balığı (*Ictalurus punctatus*) juvenillerinde kimyasal ajanlar ile maruziyette oluşan hücre hasarı ile apoptozun ortaya çıkması ve Hsp70 ekspresyonunda gözlenen inhibisyon korelasyon göstermiştir [119].

Özetlenecek olursa, DBP maruziyeti sonucu doz grubu sazanların solungaç dokularında 4. ve 24. saatte tespit ettiğimiz Hsp70 mRNA ve protein seviyelerindeki azalma, 96. saate kadar solungaç dokularında histolojik yanıt oluşmasına dayandırılabilir. DBP solungaçlarda SOD ve GPx seviyelerinde artışa sebep olmamıştır. DBP belki de, protein kinazlamanın artırılması ile alternatif AhR-Arnt nükleer translokasyon yolunun aktive edilmesi ve bu yolla CYP1A ekspresyonunu dolaylı olarak indüklemiş olabilir. 96. saatte gözlenen histopatolojik değişimler ve korunma mekanizması olarak hücre sayısının ve doku katmanlarının kalınlığının artırılması ve bu yanıtta protein sentez reaksiyonlarında Hsp70'in de yer almış olabileceği ihtimali, 96. saatte yaklaşık 4 katlık Hsp70 ekspresyonu artışı ile paralellik göstermektedir.

Organizmada ince barsaklarda absorbe edildikten sonra vücut içerisinde metabolitlerine ayrılmış (MBP halinde) ve plazma seviyeleri azalmış (idrarla atılma, glukuronid konjugatları halinde etkisizleştirilme) DBP molekülleri [29], karaciğerde, solungaçtakinin aksine daha zayıf bir etki göstererek, ısı şoku proteinlerinin indüklenmesine ve Hsp70 ekspresyonunun aktive edilmesine sebebiyet vermiş olabilir.

DBP'nin metabolizması daha çok ince barsaklardan emilimle başladığından, hızla oluşan MBP ve glukuronid konjugatı bileşiklerinin karaciğere vena portae ile aglikon halinde taşınarak SOD ve GPx seviyelerinde artışa sebep olduğu görülmektedir. DBP maruziyetinden sonra 24. ve 96. saat aralığında CYP1A seviyelerindeki katlı düşüş ve SOD-GPx ROS süpürücülerinin katlı artışı arasındaki ilişki, "oluşan peroksit ve süperoksit anyonlarının klerensini sağlamak için hücresel regülasyonla, hidrofilik reaktifleri, peroksitleri ve oksijen radikallerini üreten sitokrom P450'lerin ve oksidazların dahil olduğu faz I reaksiyonlarının baskılanması, radikallerin klerensini sağlayan SOD-GPX ikilisinin ise aktive olması

tercih edilmiştir” şeklinde açıklanabilir. CYP1A aktivitesi sonucu ortaya çıkan metabolitler oksidatif stres yaratırlar ve karsinogenik-mutajenik etkiye sahip bu ürünler hücreyi ölüme sürükleyebilirler. Eğer hücre strese karşı yanıt olarak savunma yolunu seçmiş ise, CYP1A'nın apoptozu indükleyebilen radikalleri üretmesinin engellenmesi için CYP1A'nın baskılandığı fikri güç kazanmış olur. Bu varsayım Hsp70'in karaciğerde seviyelerinin katlı artışına da açıklık kazandırabilir.

Bu çalışmanın diğer sonuçları olarak, kirlilik biyobelirteci sıfatıyla kullanılacak stres proteinlerinin gen ekspresyon ve protein seviyelerindeki değişimler referans alınarak, sucül ortama bulaşmış fitalatların ve diğer sanayi atıklarının sucül organizmalarda yarattığı tahribatın boyutları, kirlilik seviyesi ve ekotoksikolojik değerlendirmelerin yapılabilmesi için literatür kaynağı ve metot belirleme çıktıları sayılabilir. Bugüne kadar balıklarda ve diğer bazı sucül organizmalarda kirlilik biyobelirteci olarak CYP1A [177], [187]-[191], SOD [204], [205] ve GPx aktiviteleri [208], [213], [221], ovipar vertebratlarda endokrin bozucu kimyasalların belirlenmesinde plazma Vtg ve sitozolik ER α seviyeleri [223], [232], [236], [237], proteotoksisite yaratan kimyasal kirleticilerin biyobelirteci olarak karaciğer, böbrek ve solungaç Hsp70 seviyeleri [107], [123], [126]-[129], [136]-[138] çalışılmıştır. Teknolojinin ivmeli gelişmesi ve moleküler biyolojide kullanılan real-time PCR ve dijital PCR, mikroarray gibi teknolojilerin moleküler toksikoloji alanında kullanılmasıyla daha kesin, hassas, tekrarlanabilir ve hızlı yöntemlerin belirlenmesi ve doğrulanması sağlanmaktadır. Bu çalışma ile DBP gibi bir kimyasal kirleticinin, Hsp70, CYP1A, Vtg, SOD ve GPx gibi kirlilik biyobelirteçlerinin gen ekspresyonu ve protein seviyeleri düzeyinde nasıl etkilendiği ortaya konulmuş, ayrıca model organizma olarak önerilen sazan balığının ekotoksikolojik deneysel model olarak kullanılacağı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Huang, P.C., Tien, C.J., Sun, Y.M., Hsieh, C.Y., Lee, C.C., Occurrence of phthalates in sediment and biota: relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor, *Chemosphere*, 73, 539–44, **2008**.
- [2] Staples, C.A.S., Dams, W.J.A., Arkerton, T.F.P., Orsuch, J.W.G., Iddinger, G.R.B., Einert, K.H.R., Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters, *Environmental Toxicology Reviews*, 16, 875–891, **1997**.
- [3] Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kresten, O., Wollenberger, L., Santos, E.M., Paull, G.C., Van Look, K.J.W., Tyler, R., Kusk, O., Tyler, C.R., A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philosophical Transactions of The Royal Society B*, 364, 2047–2062, **2009**.
- [4] Danish Environmental Protection Agency, *Annex XV Restriction Report Proposal for a Restriction*, Denmark, **2011**.
- [5] European Chemicals Bureau, *EURAR (European Union Risk Assessment Report), Dibutyl Phthalate*, Luxembourg, **2004**.
- [6] Rudel, R.A., Camann, D.E, Spengler, J.D., Korn, L.R., Brody, J.G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust, *Environmental Science & Technology*, 37, 4543–4553, **2003**.
- [7] Adeniyi, A.A., Okedeyi, O.O., Yusuf, K.A., Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria, *Environmental Monitoring and Assessment*, 172, 561–569, **2011**.
- [8] Canadian Council of Ministers of the Environment, *Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Phthalate Esters DEHP, DBP, DOP*, QC, Canada, **1999**.
- [9] ECHA (European Chemicals Agency), *Member State Committee Support Document for Identification of Dibutyl Phthalate (DBP) As A Substance of Very High Concern*, **2008**.
- [10] Resmi Gazete, No. 25972, 20.10.2005, *Ftalat tebligı*. sf. 1, Türkiye, **2005**.
- [11] Adewuyi, G.O., High Performance Liquid Chromatographic Identification and Estimation of Phthalates in Sewer Waste and a Receiving River in Ibadan City, Southwestern Nigeria, 2012-October, 851–858, **2012**.
- [12] Fatoki, O.S., and Noma, A., Determination of Phthalate Esters in the Aquatic Environment, *South African Journal of Chemistry*, 54, 69–83, **2001**.
- [13] Fatoki, O.S., Bornman, M., Ravandhalala, L., Chimuka, L., Genthe, B., Adeniyi, A., Phthalate ester plasticizers in freshwater systems of Venda, South Africa and Potential Health Effects, *Water South Africa*, 36, 117–126, **2010**.

- [14] Hashizume, K., Anya, J.N., Oda, C.T., Asui, T.Y., Agano, H.N., Ojima, N.K., Phthalate Esters Detected in Various Water Samples and Biodegradation of the Phthalates by Microbes Isolated from River Water, *Biological&Pharmacological Bulletin*, 25, 209–214, **2002**.
- [15] Clewell, R.A., Campbell, J.L., Ross, S.M., Gaido, K.W., Clewell, H.J., Andersen, M.J., Assessing the relevance of in vitro measures of phthalate inhibition of steroidogenesis for in vivo response, *Toxicology In Vitro*, 24, 327–334, **2010**.
- [16] Jobling, S., Reynolds, T., R. White, M. G. Parker, and J. P. Sumpter, A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic, *Environmental Health Perspectives*, 103, 582–587, **1995**.
- [17] Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism?, *Toxicological Sciences*, 43, 47–60, **1998**.
- [18] Salazar, V., Castillo, C., Ariznavarreta, C., Campón, R., Tresguerres, J.A.F., Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring, *Toxicology*, 205, 131–137, **2004**.
- [19] Jee, J.H., Koo, J.G., Keum, Y.H., Park, K.H., Choi, S.H., Kang, J.C., Effects of dibutyl phthalate and di-ethylhexyl phthalate on acetylcholinesterase activity in bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson), *Journal of Applied Ichthyology*, 25, 771–775, **2009**.
- [20] Marsman, D.S., *Dibutyl phthalate, NTP Toxicity Report*, USA, 30, **1995**.
- [21] Tanaka, A., Matsumoto, A., Yamaha, T., Biochemical studies on phthalic esters. III. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals, *Toxicology*, 9, 109–123, **1978**.
- [22] WHO (World Health Organization), International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 189 di-n-butyl Phthalate, <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/> (Aralık, **2013**).
- [23] White, R.D., Carter, D.E., Earnest, D., Mueller, J., Absorption and metabolism of three phthalate diesters by the rat small intestine, *Food Cosmetics and Toxicology*, 18, 383–386, **1980**.
- [24] Singh, A.R., Lawrence, W.H., Autian, J., Maternal-fetal transfer of ¹⁴C-di-2-ethylhexyl phthalate and ¹⁴C-diethyl phthalate in rats, *Journal of Pharmacological Sciences*, 64, 1347–1350, **1975**.
- [25] Autian, J., Toxicity and health threats of phthalate esters: review of the literature, *Environmental Health Perspectives*, 4, 3–26, **1973**.
- [26] Anderson, W.A., Castle, L., Scotter, M.J., Massey, R.C., Springall, C., A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters, *Food Additives and Contaminants*, 18, 1068-1074, **2001**.

- [27] Silva, M.J., Barr, D.B., Reidy, J.A., Kato, K., Malek, N.A., Hodge, C.C., Hurtz, D., Calafat, A.M., Needham, L.L., Brock, J.W., Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites, *Archives of Toxicology*, 77, 561–567, **2003**.
- [28] Calafat, A.M., Slakman, A.R., Silva, M.J., Herbert, A.R., Needham, L.L., Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites, *Journal of Chromatography-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 805, 49–56, **2004**.
- [29] Elsis, A.E., Carter, D.E., Sipes, I.G., Dermal absorption of phthalate diesters in rats, *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 70–77, **1989**.
- [30] Scott, R.C., Dugard, P.H., Ramsey, J.D., Rhodes, C., In vitro absorption of some o-phthalate diesters through human and rat skin, *Environmental Health Perspectives*, 74, 223–227, **1987**.
- [31] Hanioka, N., Takahara, Y., Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Narimatsu, S., Hydrolysis of di-n-butyl phthalate, butylbenzyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in human liver microsomes, *Chemosphere*, 89, 1112–1117, **2012**.
- [32] Kremer, J.J., Williams, C.C., Parkinson, H.D., Borghoff, S.J., Pharmacokinetics of monobutylphthalate, the active metabolite of di-n-butylphthalate, in pregnant rats, *Toxicology Letters*, 159, 144–153, **2005**.
- [33] Srivastava, S.P., Srivastava, S., Saxena, D.K., Chandra, S.V., Seth, P.K., Testicular effects of di-n-butyl phthalate (DBP): biochemical and histopathological alterations, *Archives of Toxicology*, 64, 148–152, **1990**.
- [34] Walseth, F., Nilsen, O.G., Phthalate esters: effects of orally administered dibutylphthalate on cytochrome P-450 mediated metabolism in rat liver and lung, *Acta Pharmacologie et Toxicologie*, 59, 263-269, **1986**.
- [35] Shultz, V.D., Phillips, S., Sar, M., Foster, P.M., Gaido, K.W., Altered gene profiles in fetal rat testes after *in utero* exposure to di(n-butyl) phthalate, *Toxicological Sciences*, 64, 233–242, **2001**.
- [36] Barlow, N.J., Phillips, S.L., Wallace, D.G., Sar, M., Gaido, K.W., Foster, P.M.D., Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate, *Toxicological Sciences*, 73, 431–441, **2003**.
- [37] Thompson, C.J., Ross, S.M., Gaido, K.W., Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism, *Endocrinology*, 145, 1227–1237, **2004**.
- [38] Lehmann, K.P., Phillips, S., Sar, M., Foster, P.M.D., Gaido, K.W., Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate, *Toxicological Sciences*, 81, 60–68, **2004**.
- [39] Zeiger, E., Haworth, S., Mortelmans, K., Speck, W., Mutagenicity testing of di(2-ethylhexyl)phthalate and related chemicals in *Salmonella*, *Environmental Mutagenesis*, 7, 213–232, **1985**.

- [40] Barber, E.D., Cifone, M., Rundell, J., Przygoda, R., Astill, B.D., Moran, E., Mulholland, A., Robinson, E., Schneider, B., Results of the L5178Y mouse lymphoma assay and the Balb/3t3 cell in vitro transformation assay for eight phthalate esters, *Journal of Applied Toxicology*, 20, 69–80, **2000**.
- [41] Kobayashi, T., Niimi, S., Kawanishi, T., Fukuoka, M., Hayakawa, T., Changes in peroxisome proliferator-activated receptor α -regulated gene expression and inhibin/activin A follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate, *Toxicology Letters*, 138, 215–225, **2003**.
- [42] Fan, L.Q., Brown-Borg, H., Brown, S., Westin, S., Mode, A., Corton, J.C., PPAR α activators down-regulate CYP2C7, a retinoic acid and testosterone hydroxylase, *Toxicology*, 203, 41–48, **2004**.
- [43] Fan, L.Q., You, L., Brown-Borg, H., Brown, S., Edwards, R.J., Corton, J.C., Regulation of phase I and phase II steroid metabolism enzymes by PPAR α activators, *Toxicology*, 204, 109–121, **2004**.
- [44] Wyde, M.E., Kirwan, S.E., Zhang, F., Laughter, A., Hoffman, H.B., Bartolucci-Page, E., Gaido, K.W., Yan, B., You, L., Di-n-butyl phthalate activates constitutive androstane receptor and pregnane X receptor and enhances the expression of steroid-metabolizing enzymes in the liver of rat fetuses, *Toxicological Sciences*, 86, 281–290, **2005**.
- [45] Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.H., Wu, Z.F., Fielden, M.R., Matthews, J.B., Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters, *Toxicological Sciences*, 46, 282–293, **1998**.
- [46] Seidlová-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone, *Toxicology*, 205, 103–112, **2004**.
- [47] Gwinn, M. R., Whipkey, D. L., Tennant, L. B., & Weston, A., Gene expression profiling of di-n-butyl phthalate in normal human mammary epithelial cells. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology*, 26, 51-61, **2007**.
- [48] Seek Rhee, G., Hee Kim, S., Sun Kim, S., Hee Sohn, K., Jun Kwack, S., Ho Kim, B., Lea Park, K., Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system, *Toxicology In Vitro*, 16, 443–448, **2002**.
- [49] Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Weissacher, H., Harréus, U.A., Genotoxicity of di-butyl-phthalate and di-iso-butyl-phthalate in human lymphocytes and mucosal cells, *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 21, 189–96, **2001**.
- [50] Parveen, M., Inoue, A., Ise, R., Tanji, M., Kiyama, R., Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (EstrArray), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1416–1425, **2008**.

- [51] Guerra, M.T., Scarano, W.R., De Toledo, F.C., Franci, J.A.A., Kempinas, W.D.G., Reproductive development and function of female rats exposed to di-n-butyl-phthalate (DBP) *in utero* and during lactation, *Reproductive Toxicology*, 29, 99–105, **2010**.
- [52] Lovekamp-Swan, T., Davis, B.J., Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system, *Environmental Health Perspectives*, 111, 139–145, **2003**.
- [53] Kim, S.J., Park, H., Yu, S.Y., Kim, J., Ha, J., Youn, J., An, Y.R., Oh, M., Hwang, S.Y., Toxicogenomic Effect of Liver-toxic Environmental Chemicals in Human Hepatoma Cell Line, *Molecular and Cellular Toxicology*, 5, 310-316, **2009**.
- [54] Foster, P.M.D., Mode of Action : Impaired Fetal Leydig Cell Function-Effects on Male Reproductive Development Produced by Certain Phthalate Esters, *Critical Reviews in Toxicology*, 35, 713–719, **2005**.
- [55] Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R.C., Foster, P.M., Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 156, 81–95, **1999**.
- [56] Wilson, V.S., Lambright, C., Furr, J., Ostby, J., Wood, V., Held, G., Gray, L.E., Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis, *Toxicology Letters*, 146, 207–215, **2004**.
- [57] Parks, L.G., Ostby, J.S., Lambright, C.R., Abbott, B.D., Klinefelter, G.R., Barlow, N.J., Gray, L.E., The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat, *Toxicological Sciences*, 58, 339–349, **2000**.
- [58] Howdeshell, K.L., Furr, J., Lambright, C.R., Rider, C.V., Wilson, V.S., Gray, L.E., Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes, *Toxicological Sciences*, 99, 190–202, **2007**.
- [59] Kang, S.C., Lee, B.M., DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68, 1995–2003, **2005**.
- [60] Skliris, G.P., Munot, K., Bell, S.M., Carder, P.J., Lane, S., Horgan, K., Lansdown, M.R.J., Parkes, A.T., Hanby, A.M., Markham, A.F., Speirs, V., Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model, *Journal of Pathology*, 201, 213–220, **2003**.
- [61] Iwase, H., Omoto, Y., Iwata, H., Toyama, T., Hara, Y., Ando, Y., Ito, Y., Fujii, Y., Kobayashi, S., DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancers, *British Journal of Cancer*, 80, 1982–1986, **1999**.

- [62] Horvath, L.G., Henshall, S.M., Lee, C.S., Head, D.R., Quinn, D.I., Makela, S., Delprado, W., Golovsky, D., Brenner, P.C., O'Neill, G., Kooner, R., Stricker, P.D., Grygiel, J.J., Gustafsson, J.A., Sutherland, R.L., Frequent loss of estrogen receptor-beta expression in prostate cancer, *Cancer Research*, 61, 5331–5335, **2001**.
- [63] Okita, R.T., Okita, J.R., Effects of diethyl phthalate and other plasticizers on laurate hydroxylation in rat liver microsomes, *Pharmaceutical Research*, 9, 1648–1653, **1992**.
- [64] Drake, A.J., van den Driesche, S., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Seckl, J.R., Sharpe, R.M., Glucocorticoids amplify dibutyl phthalate-induced disruption of testosterone production and male reproductive development, *Endocrinology*, 150, 5055–5064, **2009**.
- [65] Heng, K., Teerds, K., Ivell, R., The endocrine disruptors dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats, *International Journal of Andrology*, 35, 353–363, **2012**.
- [66] Li, Y., Zhuang, M., Li, T., Shi, N., Neurobehavioral toxicity study of dibutyl phthalate on rats following *in utero* and lactational exposure, June, 603-611, **2009**.
- [67] Krüger, T., Long, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor, *Toxicology*, 246, 112–123, **2008**.
- [68] Struve, M.F., Gaido, K.W., Hensley, J.B., Lehmann, K.P., Ross, S.M., Sochaski, M.A., Willson, G.A., Reproductive Toxicity and Pharmacokinetics of di-n-butyl Phthalate (DBP) Following Dietary Exposure of Pregnant Rats, *Birth Defects Research (Part B)*, 86, 345-354, **2009**.
- [69] Hu, J., Du, G., Zhang, W., Huang, H., Chen, D., Wu, D., Wang, X., Short-term neonatal/prepubertal exposure of dibutyl phthalate (DBP) advanced pubertal timing and affected hypothalamic kisspeptin/GPR54 expression differently in female rats, *Toxicology*, 314, 65–75, **2013**.
- [70] Adams, W.J., Biddinger, G.R., Robillard, K.A., Gorsuch, J.W., A Summary of the Acute Toxicity of 14 Phthalate Esters To Representative Aquatic Organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1569-1574, **1995**.
- [71] McCarthy, J.F., Whitmore, D.K., Chronic toxicity of di-n-butyl and di-n-octyl phthalate to *Daphnia magna* and the fathead minnow, *Environmental Toxicology Chemistry*, 4, 167–179, **1985**.
- [72] Laughlin, R.B., Neff, J.M., Hrun, Y.C., Goodwin, T.C., Giam, C.S. The effects of three phthalate esters on the larval development of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* (Holthuis), *Water, Air&Soil Pollution*, 9, 323-336, **1978**.
- [73] Hu, X., Wen, B., Zhang, S., Shan, X., Bioavailability of phthalate congeners to earthworms (*Eisenia fetida*) in artificially contaminated soils, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 26–34, **2005**.

- [74] Lee, S.M., Lee, S.B., Park, C.H., Choi, J., Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring, *Chemosphere*, 65, 1074-1081, **2006**.
- [75] Gillesby, B.E., Zacharewski, T.R., Exoestrogens: Mechanisms of action and strategies for identification and assessment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 3–14, **1998**.
- [76] Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., Development of a Reproductive Performance Test for Endocrine Disrupting Chemicals Using Pair-Breeding Fathead Minnows (*Pimephales promelas*), *Environmental Science&Technology*, 34, 3003-3011, **2000**.
- [77] Barse, A.V., Chakrabarti, T., Ghosh, T.K., Pal, A.K., Jadhao, S.B., Endocrine disruption and metabolic changes following exposure of *Cyprinus carpio* to diethyl phthalate, *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 36–42, **2007**.
- [78] Allen, Y.T., Katsiadaki, I., Pottinger, T.G., Jolly, C., Matthiessen, P., Mayer, I., Smith, A., Scott, A.P., Eccles, P., Sanders, M.B., Pulman, K.G.T., Feist, S., Intercalibration exercise using a stickleback endocrine disrupter screening assay, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 404–412, **2008**.
- [79] Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Miller, D.H., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinovi, D., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, L., Wang, R., Watanabe, K.H., Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action, *Aquatic Toxicology*, 92, 168–178, **2009**.
- [80] Neumann, N.F., Galvez, F., DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology?, *Biotechnology Advances*, 20, 391–419, **2002**.
- [81] Snape, J.R., Maund, S.R., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology, *Aquatic Toxicology*, 67, 143–154, **2004**.
- [82] Ankley, G.T., Daston, G.P., Degitz, S.J., Denslow, N.D., Hoke, R.A., Kennedy, S.W., Miracle, A.L., Perkins, E.J., Snape, J., Tillitt, D.E., Tyler, C.R., Versteeg, D., Toxicogenomics in regulatory ecotoxicology, *Environmental Science&Technology*, 40, 4055–4065, **2006**.
- [83] Tyler, C.R., Filby, A.L., van Aerle, R., Lange, A., Ball, J., Santos, E.M., Christer H., Peter, K., Fish toxicogenomics, *Advances in Experimental Biology*, 2, 324–325, **2008**.

- [84] Kusk, K.O., Krüger, T., Long, M., Taxvig, C., Lykkesfeldt, A.E., Frederiksen, H., Andersson, A.M., Andersen, H.R., Hansen, K.M.S., Nellesmann, C., Bonefeld-Jørgensen, E.C., Endocrine potency of wastewater: contents of endocrine disrupting chemicals and effects measured by in vivo and in vitro assays, *Environmental Toxicology&Chemistry*, 30, 413–426, **2011**.
- [85] Hasselberg, L., Grøsvik, B.E., Goksøyr, A., Celander, M.C., Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Comparative Hepatology*, 4, 2, **2005**.
- [86] Hasselberg, L., Meier, S., Svardal, A., Hegelund, T., Celander, M.C., Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Aquatic Toxicology*, 67, 303–313, **2004**.
- [87] Sen, A., Ulutas, O.K., Tutuncu, B., Ertas, N., Cok, I., Determination of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) induction in leaping mullet (*Liza saliens*) from the highly contaminated Aliaga Bay, Turkey, *Environmental Monitoring&Assessment*, 165, 87–96, **2010**.
- [88] Sebaugh, J.L., Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation, *Pharmaceutical Statistics*, 10, 128–34, **2011**.
- [89] Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W., McCall, D., Alternative methods for the median lethal dose (LD50) test: the up-and-down procedure for acute oral toxicity, *ILAR Journal*, 43, 233–43, **2002**.
- [90] Murado, M.A., Prieto, M.A., NOEC and LOEC as merely concessive expedients: two unambiguous alternatives and some criteria to maximize the efficiency of dose-response experimental designs, *The Science of the Total Environment*, 461, 576–86, **2013**.
- [91] Arnot, J.A., Gobas, F.A., A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms, *Environmental Reviews*, 14, 257–297, **2006**.
- [92] Jaworska, J.S., Hunter, R.S., Schultz, T.W., Quantitative structure-toxicity relationships and volume fraction analyses for selected esters, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 86–93, **1995**.
- [93] Watanuki, H., Gushiken, Y., Sakai, M., In vitro modulation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) phagocytic cells by Di-n-butyl phthalate and Di-2-ethylhexyl phthalate, *Aquatic Toxicology*, 63, 119–126, **2003**.
- [94] Lockshin, R.A., Zakeri, Z., Cell death in health and disease, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11, 1214–24, **2007**.
- [95] Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O., Samali, A., Cellular stress responses: cell survival and cell death, *International Journal of Cell Biology*, 2010, 23, **2010**.

- [96] Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., Idle, J.R., Xenobiotic metabolism: A view through the metabolometer, *Chemical Research in Toxicology*, 23, 851-860, **2010**.
- [97] Deane, E.E., Woo, N.Y.S., Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21, 153–185, **2011**.
- [98] Martindale J.L., Holbrook, N.J., Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival, *Journal of Cellular Physiology*, 192, 1–15, **2002**.
- [99] Cao, J., Zhang, X., Wang, Q., Jia, L., Zhang, Y., Zhao, X., Influence of flavonoid extracts from celery on oxidative stress induced by dichlorvos in rats, *Human&Experimental Toxicology*, 31. 617–625, **2012**.
- [100] Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far?, *Life Sciences*, 86, 377–384, **2010**.
- [101] Snyder M.J., Mulder, E.P., Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure, *Aquatic Toxicology*, 55, 177-190, **2001**.
- [102] Scheil, V., Zu, A., Ko, H., Embryo Development, Stress Protein (Hsp70) Responses, and Histopathology in Zebrafish (*Danio rerio*) Following Exposure to Nickel Chloride, Chlorpyrifos, and Binary Mixtures of Them, *Environmental Toxicology*, 25, 83–93, **2009**.
- [103] Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., The heat shock response: life on the verge of death, *Molecular Cell*, 40, 253–66, **2010**.
- [104] Kregel, K.C., Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance, *Journal of Applied Physiology*, 92, 2177–2186, **2002**.
- [105] Pockley, A.G., Muthana, M., Calderwood, S.K., The dual immunoregulatory roles of stress proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 71–79, **2008**.
- [106] Santacruz, H., Vriz, S., Angelier, N., Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts, *Developmental Genetics*, 21, 223-233, **1997**.
- [107] Ali, K.S., Dorgai, L., Ábrahám, M., Hermes, E., Tissue- and stressor-specific differential expression of two hsc70 genes in carp, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307, 503–509, **2003**.
- [108] Silver, J.T., Noble, E.G., Regulation of survival gene hsp70, *Cell Stress & Chaperones*, 17, 1–9, **2012**.
- [109] Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B., Vijayan, M.M., Heat shock protein expression in fish, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8, 35-56, **1998**.

- [110] Ahn, S.G., Kim, S.A., Yoon, J.H., Vacratsis, P., Heat-shock cognate 70 is required for the activation of heat-shock factor 1 in mammalian cells, *The Biochemical Journal*, 392, 145–52, **2005**.
- [111] Faught, L.E., Modulation of Extracellular Heat Shock Protein 70 Levels in Rainbow Trout, Thesis of Master of Science, University of Waterloo, Ontario, **2013**.
- [112] Råbergh, C.M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Björklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M., Sistonen, L., Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress, *Journal Experimental Biology*, 203, 1817–1824, **2000**.
- [113] Yamashita, M., Yabu, T., Ojima, N., Stress Protein HSP70 in Fish, *Aqua-BioScience Monographs*, 3, 111–141, **2010**.
- [114] Vijayan, M.M., Pereira, C., Forsyth, R.B., Kennedy, C.J., Iwama, G.K., Handling stress does not affect the expression of hepatic heat shock protein 70 and conjugation enzymes in rainbow trout treated with beta-naphthoflavone, *Life Sciences*, 61, 117–127, **1997**.
- [115] Duffy, L.K., Scofield, E., Rodgers, T., Patton, M., Bowyer, R.T., Comparative baseline levels of mercury, Hsp70 and Hsp60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 124, 181–186, **1999**.
- [116] Hassanein, H.M., Banhaway, M.A., Soliman, M.F., Abdel-Rehim, S.A., Müller, W.E., Schröder, H.C., Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37, 78–84, **1999**.
- [117] Bowen, L., Werner, I., Johnson, M.L., Physiological and behavioral effects of zinc and temperature on coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), *Hydrobiologia*, 559, 161–168, **2006**.
- [118] Janz, D.M., McMaster, M.E., Weber, L.P., Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G., Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent, *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58, 620-625, **2001**.
- [119] Weber, L.P., Janz, D.M., Effect of beta-naphthoflavone and dimethylbenz[a]anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary, *Aquatic Toxicology*, 54, 39–50, **2001**.
- [120] Fulladosa, E., Deane, E., Ng, A.H.Y., Woo, N.Y.S., Murat, J.C., Villaescusa, I., Stress proteins induced by exposure to sublethal levels of heavy metals in sea bream (*Sparus sarba*) blood cells, *Toxicology In Vitro*, 20, 96–100, **2006**.
- [121] Carnevali O., Maradonna, F., Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers, *General and Comparative Endocrinology*, 131, 203-208, **2003**.

- [122] Moreland, J.J., Arrieta, D.E., Washburn, B.S., Effects of estrogen on the stress response in CuSO₄-exposed PLHC-1 cells, *Marine Environmental Research*, 50, 509–512, **2000**.
- [123] Heinlein C.A., Chang, C., Role of chaperones in nuclear translocation and transactivation of steroid receptors, *Endocrine*, 14, 143–149, **2001**.
- [124] Evans, T.G., Yamamoto, Y., Jeffery, W.R., Krone, P.H., Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation, *Cell Stress & Chaperones*, 10, 66–78, **2005**.
- [125] Evans, T.G., Belak, Z., Ovsenek, N., Krone, P.H., Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 131–140, **2007**.
- [126] Chen, C., Zhou, Q., Liu, S., Xiu, Z., Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks, *Chemosphere*, 83, 1147–1154, **2011**.
- [127] Kukreja, R.C., Kontos M.C., Loesser K. E., Batra S. K., Qian Y. Z., Gbur Jr C. J., Naseem S. A., Jess R. L., Hess M. L., Oxidant stress increases heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *American Journal of Physiology*, 267, 2213-2219, **1994**.
- [128] Xing, H., Li, S., Wang, X., Gao, X., Xu, S., Wang, X., Effects of atrazine and chlorpyrifos on the mRNA levels of HSP70 and HSC70 in the liver, brain, kidney and gill of common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Chemosphere*, 90, 910–916, **2013**.
- [129] Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 78, 846–852, **2010**.
- [130] Deane, E.E., Woo, N.Y.S., Impact of heavy metals and organochlorines on hsp70 and hsc70 gene expression in black sea bream fibroblasts, *Aquatic Toxicology*, 79, 9–15, **2006**.
- [131] Sinha, A.K., Diricx, M., Chan, L.P., Liew, H.J., Kumar, V., Blust, R., De Boeck, G., Expression pattern of potential biomarker genes related to growth, ion regulation and stress in response to ammonia exposure, food deprivation and exercise in common carp (*Cyprinus carpio*), *Aquatic Toxicology*, 122, 93–105, **2012**.
- [132] Airaksinen, S., Råbergh, C.M., Sistonen, L., Nikinmaa, M., Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells, *Journal of Experimental Biology*, 201, 2543–51, **1998**.
- [133] Blake, M.J., Udelsman, R., Feulner, G.J., Norton, D.D., Holbrook, N.J., Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: an adrenocorticotrophic hormone-sensitive, age-dependent response, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 88, 9873–9877, **1991**.
- [134] Iwama, G.K., Vijayan, M.M., Forsyth, R.B., Ackerman, P.A., Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish, *Integrative and Comparative Biology*, 39, 901–909, **1999**.

- [135] Sung, Y.Y., Roberts, R.J., Bossier, P., Enhancement of Hsp70 synthesis protects common carp, *Cyprinus carpio* L., against lethal ammonia toxicity, *Journal of Fish Diseases*, 35, 563–568, **2012**.
- [136] Vijayan, M.M., Pereira, C., Kruzynski, G., Iwama, G.K., Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids, *Aquatic Toxicology*, 40, 101–108, **1998**.
- [137] Simpkins, A.M., Tatum, T.E., Cardin, D.L., Wolf, W.C., Metallothionein and heat-shock protein 70 induction in caged and wild fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to the Ouachita River, Louisiana, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 76, 98–106, **2013**.
- [138] Papaconstantinou, A.D., Fisher, B.R., Umbreit, T.H., Brown, K.M., Increases in Mouse Uterine Heat Shock Protein Levels Are a Sensitive and Specific Response to Uterotrophic Agents, *Environmental Health Perspectives*, 110, 1207–1212, **2002**.
- [139] Davies, K.J., An overview of oxidative stress, *IUBMB Life*, 50, 241–244, **2000**.
- [140] Lushchak, V.I., Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals, *Aquatic Toxicology*, 101, 13–30, **2010**.
- [141] Nathan C., Cunningham-Bussel, A., Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species, *Nature Reviews. Immunology*, 13, 349–61, **2013**.
- [142] Hermes-Lima, M., *Oxygen Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals*. John Wiley&Sons, Inc., **2004**.
- [143] Ray, P.D., Huang, B.W., Tsuji, Y., Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cellular Signalling*, 24, 981–990, **2012**.
- [144] Arnér, E.S., Holmgren, A., Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *European Journal of Biochemistry*, 267, 6102–6109, **2000**.
- [145] Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Lowther, W.T., Matthews, B., St John, G., Nathan, C., Brot, N., Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 397, 172–178, **2002**.
- [146] Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.), *The Science of the Total Environment*, 309, 105–115, **2003**.
- [147] Farombi, E.O., Adelowo, O.A., Ajimoko, Y.R., Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4, 158–65, **2007**.

- [148] Sen, A., Sahin, B., Agus, H.H., Bayav, M., Sevim, H., Semiz, A., Prevention of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity by *Urtica urens* in Rats, *Journal of Applied Biological Sciences*, 1, 29–32, **2007**.
- [149] Anonim, Your Future Health, <http://www.yourfuturehealth.org/Chronic-Fatigue-Syndrome.php> (Aralık, **2013**).
- [150] Livingstone, D.R., Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, *Marine Pollution Bulletin*, 42, 656–66, **2001**.
- [151] Özerol, E., Sitokrom P450 Monooksijenaz Enzim Sistemleri, *Journal of Turgut Özal Medical Center*, 3, 257–275, **1996**.
- [152] Lewis, D.F., On the recognition of mammalian microsomal cytochrome P450 substrates and their characteristics: towards the prediction of human p450 substrate specificity and metabolism, *Biochemical Pharmacology*, 60, 293–306, **2000**.
- [153] Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Cancer Science*, 95, 1–6, **2004**.
- [154] Redlich, G., Zanger, U.M., Riedmaier, S., Bache, N., Giessing, A.B.M., Eisenacher, M., Stephan, C., Meyer, H.E., Jensen, O.N., Marcus, K., Distinction between human cytochrome P450 (CYP) isoforms and identification of new phosphorylation sites by mass spectrometry, *Journal of Proteome Research*, 7, 4678–4688, **2008**.
- [155] Dai, D., Tang, J., Rose, R., Hodgson, E., Bienstock, R.J., Mohrenweiser, H.W., Goldstein, J.A., Identification of variants of CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299, 825–831, **2001**.
- [156] Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., Bernhardt, R., Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770, 330–344, **2007**.
- [157] Roberts, G.A., Grogan, G., Greter, A., Flitsch, S.L., Turner, N.J., Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus sp.*, *Journal of Bacteriology*, 184, 3898–3908, **2002**.
- [158] Poch, M.T., Cutler, N.S., Yost, G.S., Hines, R.N., Molecular mechanisms regulating human CYP4B1 lung-selective expression, *Drug Metabolism and Disposition*, 33, 1174–1184, **2005**.
- [159] Rylander, T., Neve, E.P., Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., Identification and tissue distribution of the novel human cytochrome P450 2S1 (CYP2S1), *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281, 529–35, **2001**.
- [160] Karlgren, M., Backlund, M., Johansson, I., Oscarson, M., Ingelman-Sundberg, M., Characterization and tissue distribution of a novel human cytochrome P450-CYP2U1, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 315, 679–85, **2004**.

- [161] Bartsch, H., Nair, U., Risch, A., Genetic Polymorphism of CYP Genes, Alone or in Combination, as a Risk Modifier of Tobacco-related Cancers, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 9, 3–28, **2000**.
- [162] Shimada, T., Review Xenobiotic-Metabolizing Enzymes Involved in Activation and Detoxification of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21, 257–276, **2006**.
- [163] Ulusoy, G., Association of CYP2E1, NQO1 and GST Genetic Polymorphisms with Risk of Acute Lymphoblastic Leukemia in Turkish Children, Doktora Tezi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara, **2009**.
- [164] Arinç, E., Adali, O., Gençler-Özkan, A.M., Induction of N-nitrosodimethylamine metabolism in liver and lung by in vivo pyridine treatments of rabbits, *Archives of Toxicology*, 74, 329–34, **2000**.
- [165] Agus, H.H., Tekin, P., Bayav, M., Semiz, A., Sen, A., Drug interaction potential of the seed extract of *Urtica urens* L. (dwarf nettle), *Phytotherapy Research*, 23, 1763–70, **2009**.
- [166] Haduch, A., Bromek, E., Kot, M., Jemnitz, K., Veres, Z., Vereczkey, L., Daniel, W.A., Effect of mirtazapine on the CYP2D activity in the primary culture of rat hepatocytes, *Pharmacological Reports*, 58, 979–984, **2006**.
- [167] Yue, J., Miksys, S., Hoffmann, E., Tyndale, R.F., Chronic nicotine treatment induces rat CYP2D in the brain but not in the liver: an investigation of induction and time course, *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33, 54–63, **2008**.
- [168] Kanebratt, K.P., Diczfalusy, U., Bäckström, T., Sparve, E., Bredberg, E., Böttiger, Y., Andersson, T.B., Bertilsson, L., Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 84, 589-594, **2008**.
- [169] Ozkarsli, M., Sevim, H., Sen, A., In vivo effects of *Urtica urens* (dwarf nettle) on the expression of CYP1A in control and 3-methylcholanthrene-exposed rats, *Xenobiotica*, 38, 48–61, **2008**.
- [170] Heilmann, L.J., Sheen, Y.Y., Bigelow, S.W., Nebert, D.W., Trout P450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance, *DNA*, 7, 379–87, **1988**.
- [171] Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y, Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R., Waxman, D.J., The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, and Recommended Nomenclature, *DNA and Cell Biology*, 10, 1-14, **1991**.
- [172] Ma, Q, Lu, A.Y.H., CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of *in vitro* and *in vivo* studies, *Drug Metabolism and Disposition*, 35, 1009–1016, **2007**.
- [173] Tompkins, L.M., Wallace, A.D., Mechanisms of cytochrome P450 induction, *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*, 21, 176-181, **2007**.

- [174] Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., Bradfield, C.A., The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40, 519–561, **2000**.
- [175] Burbach, K.M., Poland, A., Bradfield, C.A., Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 89, 8185–8189, **1992**.
- [176] Navas, J.M., Segner, H., Estrogen-mediated suppression of cytochrome P4501A (CYP1A) expression in rainbow trout hepatocytes: role of estrogen receptor, *Chemico-Biological Interactions*, 138, 285–98, **2001**.
- [177] Smeets, J.M.V., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Komen, H., Kaminski, N.E., Giesy, J.P., Van Den Berg, M., *In Vitro* Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti) Estrogenic Activity of Xenobiotics, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 76, 68–76, **1999**.
- [178] Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., Gustafsson, J.A., Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Transcription: Ligand-Dependent Recruitment of Estrogen p-Dioxin-Responsive Promoters, *Molecular and Cellular Biology*, 25, 5317–5328, **2005**.
- [179] Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S., The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes, *Molecular and Cellular Biology*, 23, 1843–1855, **2003**.
- [180] Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor, *Nature*, 423, 545–550, **2003**.
- [181] Delescluse, C., Lemaire, G., de Sousa, G., Rahmani, R., Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway?, *Toxicology*, 153, 73-82, **2000**.
- [182] Long, W.P., Pray-Grant, M., Tsai, J.C., Perdew, G.H., Protein kinase C activity is required for aryl hydrocarbon receptor pathway-mediated signal transduction, *Molecular Pharmacology*, 53, 691–700, **1998**.
- [183] Vogel, C.F.A., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G., Matsumura, F., RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription, *Molecular Endocrinology*, 21, 2941–2955, **2007**.
- [184] Puga, A., Ma, C., Marlowe, J.L., The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways, *Biochemical Pharmacology*, 77, 713–722, **2009**.
- [185] Mortensen, A.S., Arukwe, A., Interactions between estrogen- and Ah-receptor signalling pathways in primary culture of salmon hepatocytes exposed to nonylphenol and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (congener 77), *Comparative Hepatology*, 6, 2, **2007**.

- [186] Mortensen, A.S., Tolfsen, C.C., Arukwe, A., 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, **2006**.
- [187] Mortensen, A.S., Braathen, M., Sandvik, M., Arukwe, A., Effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (OH-PCB) congeners on the xenobiotic biotransformation gene expression patterns in primary culture of Atlantic salmon (*Salmo salar*) hepatocytes, *Ecotoxicology Environmental Safety*, 68, 351–360, **2007**.
- [188] Dorrington, T., Zanette, J., Zacchi, F.L., Stegeman, J.J., Bainy, A.C.D., Basal and 3-methylcholanthrene-induced expression of cytochrome P450 1A, 1B and 1C genes in the Brazilian guppy, *Poecilia vivipara*, *Aquatic Toxicology*, 124, 106–113, **2012**.
- [189] Hu, X., Zhou, S., Academy, C., Hu, X., Effects of enrofloxacin on cytochromes P4501A and P4503A in *Carassius auratus gibelio* (crucian carp), *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 35, 216–223, **2011**.
- [190] Fisher, M.A., Mehne, C., Means, J.C., Ide, C.F., Induction of CYP1A mRNA in Carp (*Cyprinus carpio*) from the Kalamazoo River polychlorinated biphenyl-contaminated superfund site and in a laboratory study, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 14–22, **2006**.
- [191] Zhou, C., Li, X.C., Fang, W.F., Yang, X.L., Hu, L.L., Zhou, S., Zhou, J.F., Inhibition of CYP450 1A and 3A by berberine in crucian carp *Carassius auratus gibelio*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 154, 360–366, **2011**.
- [192] Gjernes, M.H., Schlenk, D., Arukwe, A., Estrogen receptor-hijacking by dioxin-like 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in salmon hepatocytes involves both receptor activation and receptor protein stability, *Aquatic Toxicology*, 125, 197–208, **2012**.
- [193] Chung-Davidson, Y.W., β -naphthoflavone induction of CYP1A in brain of juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush* Walbaum), *Journal of Experimental Biology*, 207, 1533–1542, **2004**.
- [194] Valdehita, A., Fernández-Cruz, M.L., Torrent, F., Sericano, J.L., Navas, J.M., Differences in the induction of cyp1A and related genes in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Additional considerations for the use of EROD activity as a biomarker, *Journal of Fish Biology*, 81, 270–287, **2012**.
- [195] An, L., Hu, J., Yang, M., Zheng, B., Wei, A., Shang, J., Zhao, X., CYP1A mRNA expression in redeye mullets (*Liza haematocheila*) from Bohai Bay, China, *Marine Pollution Bulletin*, 62, 718–725, **2011**.
- [196] Fisher, T., Crane, M., Callaghan, A., Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 1–6, **2003**.

- [197] Di Bello, D., Vaccaro, E., Longo, V., Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Gervasi, P.G., Pretti, C., Presence and inducibility by beta-naphthoflavone of CYP1A1, CYP1B1 and phase II enzymes in *Trematomus bernacchii*, an Antarctic fish, *Aquatic Toxicology*, 84, 19-26, **2007**.
- [198] Doering, J.A., Wiseman, S., Beitel, S.C., Tendler, B.J., Giesy, J.P., Hecker, M., Tissue specificity of aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated responses and relative sensitivity of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) to an AhR agonist, *Aquatic Toxicology*, 114, 125–33, **2012**.
- [199] Barrera, G., Oxidative Stress and Lipid Peroxidation Products in Cancer Progression and Therapy, *ISRN Oncology*, 2012, 1-21, **2012**.
- [200] Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14, 840-860, **2010**.
- [201] Van Raamsdonk, J.M., Hekimi, S., Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 109, 5785–90, **2012**.
- [202] Wang, Q., Yuan, Z., Wu, H., Liu, F., Zhao, J., Molecular characterization of a manganese superoxide dismutase and copper/zinc superoxide dismutase from the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Fish&Shellfish Immunology*, 34, 1345–51, **2013**.
- [203] Yang, J., Dong, S., Jiang, Q., Si, Q., Liu, X., Yang, J., Characterization and expression of cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) gene under temperature and hydrogen peroxide (H₂O₂) in rotifer *Brachionus calyciflorus*, *Gene*, 518, 388-396, **2013**.
- [204] Arzate-Cárdenas, M.A., Martínez-Jerónimo, F., Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae): Integrated Biomarker Response implementation, *Aquatic Toxicology*, 105, 528–534, **2011**.
- [205] Li, Z., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Kolarova, J., Li, P., Randak, T., Multiple Biomarkers Responses in Juvenile Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, After Acute Exposure to a Fungicide Propiconazole, *Environmental Toxicology*, 28, 119–126, **2011**.
- [206] Hermes E., Ferencz, A., Identification of two phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (gpx4) genes in common carp, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 101–106, **2009**.
- [207] Li, G.Z., Liang, X.F., Yao, W., Liao, W.Q., Zhu, W.F. Molecular characterization of glutathione peroxidase gene from the liver of silver carp, bighead carp and grass carp, *BMB Reports*, 41, 204–209, **2008**.
- [208] Choi, C.Y., An, K.W., Nelson, E.R., Habibi, H.R., Cadmium affects the expression of metallothionein (MT) and glutathione peroxidase (GPX) mRNA in goldfish, *Carassius auratus*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 145, 595–600, **2007**.

- [209] Li, X., Liu, Y., Song, L., Liu, J., Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR, *Toxicon*, 42, 85–89, **2003**.
- [210] Amberg, J.J., Schreier, T.M., Gaikowski, M.P., Molecular responses differ between sensitive silver carp and tolerant bighead carp and bigmouth buffalo exposed to rotenone, *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 1379–91, **2012**.
- [211] Oruc, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 137, 43–51, **2004**.
- [212] Oruç, E.Ö., Usta, D., Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23, 48–55, **2007**.
- [213] Stara, A., Machova, J., Velisek, J., Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.), *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33, 334–343, **2012**.
- [214] Salvo, L.M., Bainy, A.C.D., Ventura, E.C., Marques, M.R.F., Silva, J.R.M.C., Klemz, C., Silva de Assis, H.C., Assessment of the sublethal toxicity of organochlorine pesticide endosulfan in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Environmental Science and Health*, 47, 1652–1658, **2012**.
- [215] Zheng, Q., Feng, M., Dai, Y., Comparative antioxidant responses in liver of *Carassius auratus* exposed to phthalates: An integrated biomarker approach, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36, 741–749, **2013**.
- [216] Kang, J.C., Jee, J.H., Koo, J.G., Keum, Y.H., Jo, S.G., Park, K.H., Anti-oxidative status and hepatic enzymes following acute administration of diethyl phthalate in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, a marine culture fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 1449–1455, **2010**.
- [217] Jiang, J., Gu, X., Song, R., Zhang, Q., Geng, J., Wang, X., Yang, L., Time-dependent oxidative stress and histopathological changes in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR, *Ecotoxicology*, 20, 1000–1009, **2011**.
- [218] Huang, D.J., Zhang, Y.M., Song, G., Long, J., Liu, J.H., Ji, W.H., Contaminants-induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China, *Environmental Monitoring and Assessment*, 128, 483–488, **2007**.
- [219] Cheng, L.J., Cheng, T.S., Oxidative effects and metabolic changes following exposure of greater duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to diethyl phthalate, *Aquatic Toxicology*, 109, 166–175, **2012**.
- [220] Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Wu, X., Yang, L., Oxidative stress and immune related gene expression following exposure to di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate in zebrafish embryos, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93, 39–44, **2013**.

- [221] Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2120–2129, **2003**.
- [222] Monteiro, D.A., de Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143, 141-149, **2006**.
- [223] Bowman, C.J., Kroll, K.J., Hemmer, M.J., Folmar, L.C., Denslow, N.D., Estrogen-Induced Vitellogenin mRNA and Protein in Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*), *General and Comparative Endocrinology*, 120, 300–313, **2000**.
- [224] Warriar, S.R., Subramoniam, T., Instability of crab vitellogenin and its immunological relatedness with mammalian atherogenic lipoproteins, *Molecular Reproduction and Development*, 64, 329–40, **2003**.
- [225] Bowley, L.A., Alam, F., Marentette, J.R., Balshine, S., Wilson, J.Y., Characterization of Vitellogenin Gene Expression in Round Goby (*Neogobius melanostomus*) Using A Quantitative Polymerase Chain Reaction Assay, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 2751-2760, **2010**.
- [226] Wang, H., Tan, J.T.T., Emelyanov, A., Korzh, V., Gong, Z., Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*, *Gene*, 356, 91–100, **2005**.
- [227] Kang, B.J., Jung, J., Lee, J.M., Lim, S., Saito, H., Kim, M.H., Kim, Y., Saigusa, M., Han, C., Structural and expression analyses of two vitellogenin genes in the carp, *Cyprinus carpio*, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 148, 445–453, **2007**.
- [228] Braathen M., Skjetne, Æ.A., Estrogenic Effects of Selected Hydroxy Polychlorinated Biphenyl Congeners in Primary Culture of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hepatocytes, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 450, 111–122, **2009**.
- [229] Palermo, F.A., Cocci, P., Angeletti, M., Polzonetti-Magni, A., Mosconi, G., Chemosphere PCR–ELISA detection of estrogen receptor b mRNA expression and plasma vitellogenin induction in juvenile sole (*Solea solea*) exposed to waterborne, *Chemosphere*, 86, 919–925, **2012**.
- [230] Navas, J.M., Segner, H., Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances, *Aquatic Toxicology*, 80, 1–22, **2006**.
- [231] Scholz, S., Kordes, C., Hamann, J., Gutzeit, H.O., Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels, *Marine Environmental Research*, 57, 235–244, **2004**.

- [232] Endocrin Disrupting Screening Program (EDSP), U.S. Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/endo/pubs/prioritysetting/finallist.html> (Aralık, **2013**).
- [233] Bickley, L.K., Lange, A., Winter, M.J., Tyler, C.R., Evaluation of a carp primary hepatocyte culture system for screening chemicals for oestrogenic activity, *Aquatic Toxicology*, 94, 195–203, **2009**.
- [234] Anderson, M.J., Olsen, H., Matsumura, F., Hinton, D.E., In vivo modulation of 17 beta-estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by beta-naphthoflavone, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137, 210–218, **1996**.
- [235] Korte, J.J., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Pasha, M.S., Parks, L.G., LeBlanc, G.E., Ankley, G.T., Fathead minnow vitellogenin: Complementary DNA sequence and messenger RNA and protein expression after 17 beta-estradiol treatment, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 972–981, **2000**.
- [236] Blum, J.L., Nyagode, B.A., James, M.O., Denslow, N.D., Effects of the pesticide methoxychlor on gene expression in the liver and testes of the male largemouth bass (*Micropterus salmoides*), *Aquatic Toxicology*, 86, 459–469, **2008**.
- [237] Hatef, A., Zare, A., Alavi, S.M.H., Habibi, H.R., Linhart, O., Modulations in Androgen and Estrogen Mediating Genes and Testicular Response in Male Goldfish Exposed to Bisphenol A, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 2069–2077, **2012**.
- [238] Leonardi, M.O., Puchi, M., Vitellogenin Induction and Reproductive Status in Wild Chilean Flounder *Paralichthys adspersus* (Steindachner, 1867) as Biomarkers of Endocrine Disruption Along the Marine Coast of the South Pacific, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62, 314–322, **2012**.
- [239] Liang, Y., Fang, Z., Molecular cloning and mRNA expression of the vitellogenin and nuclear receptor gene induced by 17 b -estradiol in the mud carp, *Cirrhinus molitorella*, *Ecotoxicology*, 21, 719–729, **2012**.
- [240] Rankouhi, T.R., Van Holsteijn, I., Letcher, R., Giesy, J.P., Van Den Berg, M., Effects of Primary Exposure to Environmental and Natural Estrogens on Vitellogenin Production in Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes, *Toxicological Sciences*, 80, 75–80, **2002**.
- [241] Lückstädt, C., Schill, R.O., Focken, U., Köhler, H.R., Becker, K., Stress protein Hsp70 response of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) to induced hypoxia and recovery, *Verhandlungen der Gesellschaft für Ichthyologie*, 4, 137–141, **2004**.
- [242] Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry*, 150, 76–85, **1985**.

- [243] Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations, *Biotechnology Letters*, 26, 509–515, **2004**.
- [244] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685, **1970**.
- [245] Ey, P.L., Ashman, L.K., The use of alkaline phosphatase-conjugated antiimmunoglobulin with immunoblots for determining the specificity of monoclonal antibodies to protein mixtures. *Methods in Enzymology*, (eds: Langone, J.J., Vunakis, H.V.), Academic Press, New York, 497-509, **1986**.
- [246] Zhou, D., Wang, H., Zhang, J., Di-n-butyl phthalate (DBP) exposure induces oxidative stress in epididymis of adult rats, *Toxicology and Industrial Health*, 27, 65–71, **2011**.
- [247] Barrera, G., Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy, *ISRN Oncology*, 2012, 1–22, **2012**.
- [248] Jinwal, U.K., Akoury, E., Abisambra, J.F., O'Leary, J.C., Thompson, A.D., Blair, L.J., Jin, Y., Bacon, J., Nordhues, B.A., Cockman, M., Zhang, J., Li, P., Zhang, B., Borysov, S., Uversky, V.N., Biernat, J., Mandelkow, E., Gestwicki, J.E., Zweckstetter, M., Dickey, C.A., Imbalance of Hsp70 family variants fosters tau accumulation, *FASEB Journal*, 27, 1450–1459, **2013**.
- [249] Powell, W.H., Morrison, H.G., Weil, E.J., Karchner, S.I., Sogin, M.L., Stegeman, J.J., Hahn, M.E., Cloning and analysis of the CYP1A promoter from the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*), *Marine Environmental Research*, 58, 119–24, **2004**.
- [250] Karchner, S.I., Franks, D.G., Powell, W.H., Hahn, M.E., Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 6949–6959, **2002**.
- [251] Ortiz-Zarragoitia, M., Trant, J.M., Cajaravillet, M.P., Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 2394–2404, **2006**.
- [252] Bojes, H.K., Thurman, R.G., Potent peroxisome proliferators inhibit beta-oxidation in the isolated perfused rat liver, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140, 322–327, **1996**.
- [253] Lahousse, S.A., Beall, S.A., Johnson, K.J., Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly increases celsr2 protein phosphorylation in HeLa cells via protein kinase C and casein kinase 1, *Toxicological Sciences*, 91, 255–264, **2006**.

- [254] Thompson, C.J., Ross, S.M., Hensley, J., Liu, K., Heinze, S.C., Young, S.S., Gaido, K.W. Differential steroidogenic gene expression in the fetal adrenal gland versus the testis and rapid and dynamic response of the fetal testis to di(n-butyl) phthalate, *Biology of Reproduction*, 73, 908-917, **2005**.
- [255] Agus, H.H., Sümer, S., Erkmen, B., Erkoç F., Hsp70 Expression in Fish Gill Used as an Ecotoxicological Biomarker: A Rapid, Sensitive, Reproducible and Simple Molecular Approach. *Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 23rd Annual Meeting*, 12-16 May, Glasgow, Scotland, **2013**.
- [256] Abdel-Moneim, A.M., El-Saad, A.M.A., Hussein, H.K., Dekinesh, S.I., Gill oxidative stress and histopathological biomarkers of pollution impacts in Nile tilapia from Lake Mariut and Lake Edku, Egypt, *Journal of Aquatic Animal Health*, 24, 148–60, **2012**.
- [257] Bury, N.R., Jie, L., Flik, G., Lock, R.A.C., Bonga, S.E.W., Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro, *Aquatic Toxicology*, 40, 193–202, **1998**.
- [258] Mazon, A.F., Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*, *Environmental Research*, 88, 52–63, **2002**.
- [259] Nascimento, A.A., Araújo, F.G., Gomes, I.D., Mendes, R.M.M., Sales, A., Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in south-eastern Brazil, *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 41, 209–16, **2012**.
- [260] Schett, G., Steiner, C.W., Gröger, M., Winkler, S., Graninger, W., Smolen, J., Xu, Q., Steiner, G., Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70, *FASEB Journal*, 13, 833-42, **1999**.
- [261] Liossis, S.N., Ding, X.Z., Kiang, J.G., Tsokos, G.C., Overexpression of the heat shock protein 70 enhances the TCR/CD3- and Fas/Apo-1/CD95-mediated apoptotic cell death in Jurkat T cells, *Journal of Immunology*, 158, 5668–5675, **1997**.
- [262] Hatayama, T., Yamagishi, N., Minobe, E., Sakai, K., Role of hsp105 in protection against stress-induced apoptosis in neuronal PC12 cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 528-534, **2001**.
- [263] Yamagishi, N., Saito, Y., Ishihara, K., Hatayama, T., Enhancement of oxidative stress-induced apoptosis by Hsp105 α in mouse embryonal F9 cells, *European Journal of Biochemistry*, 269, 4143–4151, **2002**.
- [264] Lee, M.W., Park, S.C., Chae, H.S., Bach, J.H., Lee, H.J., Lee, S.H., Kang, Y.K., Kim, K.Y., Lee, W.B., Kim, S.S., The protective role of HSP90 against 3-hydroxykynurenine-induced neuronal apoptosis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 261-267, **2001**.

- [265] Sreedhar, A.S., Csermely, P., Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review, *Pharmacology & Therapeutics*, 101, 227–257, **2004**.
- [266] Sreedhar, A.S., Pardhasaradhi, V.V., Khar, A., Srinivas, U.K., A cross talk between cellular signalling and cellular redox state during heat-induced apoptosis in a rat histiocytoma, *Free Radical Biology and Medicine*, 32, 221–227, **2002**.
- [267] Bijur, G.N., Jope, R.S., Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity, *Journal of Neurochemistry*, 75, 2401–2408, **2000**.
- [268] Zhang, M., Blake, M.J., Gout, P.W., Buckley, D.J., Buckley, A.R., Proteolysis of heat shock transcription factor is associated with apoptosis in rat Nb2 lymphoma cells, *Cell Growth&Differentiation*, 10, 759-767, **1999**.

EKLER

Ek 1: Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

25/09/2012

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/144 - 18976
KONU:

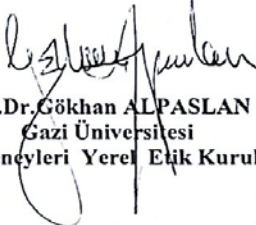
Sayın

Prof.Dr.Sibel SÜMER
Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Sibel SÜMER, Aylin SEPİCİ DİNÇEL ve Hızlan Hıncal AĞUŞ'tan oluşan, G.Ü.ET-12.084 kod numaralı ve "Çevre Kirleticisi di-n-Bütül Fitalat'ın Sazan Balıklarında (*Cyprinus Carpio*) Gen Ekspresyonu Seviyesinde Etkilerinin Araştırılması" başlıklı araştırma öneriniz; konu ile ilgili Yasa ve yönetmelikler gereği balık ve benzeri türler ile yapılan çalışmalarda Etik Kurul raporuna gerek olmamasına rağmen araştırmacı grubunun isteği üzerine metodolojik ve deney hayvanları araştırma etiği çerçevesinde incelenmiş olup, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

EK : 1 Liste

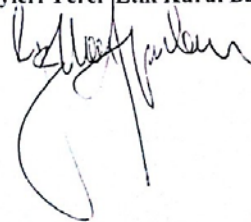

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Ek 1 devam ediyor

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 19.09.2012		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN		KATILDI	
Prof.Dr.Aydan BABÜL		KATILDI	
Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN		KATILDI	
Prof.Dr.M.Tahir HATİPOĞLU		KATILDI	
Prof.Dr.Mustafa ARK		KATILDI	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER		KATILDI	
Uzman Dr.Şeyda DİKER		KATILDI	
Arş.Gör. Esra PER		KATILDI	
Dr.Kadir BAŞAR		KATILDI	
İlknur ALKAN		KATILAMADI	

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı



ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Hızlan Hıncal Ağuş
Doğum Yeri ve Yılı : Adana/1982
Medeni Hali : Bekar
E-posta : Agus_hizlan@yahoo.com.tr
Adresi : Yurt Mh. 269 Sk. İlgim Sit. Ali Pağren Apt. D: 10,
Çukurova, Adana.

Eğitim

Lise : 1996-2000 Çukurova Elk. Anadolu Teknik Lisesi
Lisans : 2002-2006 Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : 2006-2009 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Mol. Biyoloji ABD
Doktora : 2009-2014 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, Mol. Biyoloji ABD

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce: : C1 (Avrupa Konseyi Dil Kriteri Notu) Advanced
ÜDS : 76,25

İş Deneyimi

1. Ocak 2008-Ağustos 2008 Gordion Diagnostik Biyoteknoloji Merkezi Moleküler Biyoloji ve Genetik Dept. Ar-Ge Sorumlusu
2. Ağustos 2008-Mart 2009 RTA Laboratuvarları Moleküler Arş. Mrkz. Ar-Ge Sorumlusu
3. Ağustos 2009-Ağustos 2012 DEVA Holding A.Ş. Biyoteknoloji Ar-Ge Merkezi Kurucusu ve Projeler Koordinatörü

Deneyim Alanları

Rekombinant DNA teknolojisi, rekombinant protein ve molekül fermentasyonu, memeli hücre kültürü, temel biyokimya protokolleri, gen ekspresyon çalışmaları, mikroarray, real-time PCR, IFA, ELISA, enzim kinetikleri, farmakogenetik ve farmakodinamik, GMP ve GLP alan deneyimi, HBV-HCV-HIV moleküler serotiplendirme, monoklonal antikor üretimi.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Bu tez çalışması, Prof. Dr. E. Sibel Sümer'in yürütücülüğündeki 212T185 no.'lu ve 25,690 TL bütçeli TÜBİTAK-TBAG projesi tarafından desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

1. **Agus H. H.**, Sümer S., Erkoç F. (2013) Effects of Di-butyl Phthalate (known as EDC Effective) on cytochrome P450 (CYP1A) Expression in Juvenile Common Carp. XXV. **National Congress of Biochemistry**: P168, Izmir.
2. **Agus H. H.**, Sümer S., Erkoç F. (2013) Evaluation of Housekeeping Genes in Molecular Ecotoxicology: *Cyprinus carpio* as a Model Test Organism and Determination of Heat Shock Protein mRNA Levels in Gills and Liver Stressed with Dibutyl phthalate Exposure. **FEBS Journal 280**: 219, Suppl. 1, St. Petersburg.
3. **Agus H. H.**, Sümer S., Erkmen B., Erkoç F. (2013) Hsp70 Expression in Fish Gill Used as an Ecotoxicological Biomarker: A Rapid, Sensitive, Reproducible and Simple Molecular Approach. **SETAC Europe 23rd Annual Meeting**: TH027, Glasgow, Scotland.