

Orta Düzey 17 α -Etinilestradiol ve 4-*n*-Nonilfenol Konsantrasyonlarının *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) (Cyprinidae)'nin Primer Hepatositlerinde Apoptoz Üzerine Olan Etkileri

Burak Kaptaner^{1*}, Güler Ünal²

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, 65080 Tuşba, Van, Türkiye

² Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Çocuk Gelişimi Bölümü, Aydın, Türkiye

*e-mail: bkaptaner@yyu.edu.tr

ORCID ID: B.Kaptaner: 0000-0003-2366-6756; G. Unal: 0000-0001-5920-6693

Geliş tarihi/Received:05/09/2020

Kabul tarihi/Accepted:26/06/2021

Özet

Bu çalışmada 17 α -etinilestradiol (EE₂) ve 4-*n*-nonilfenol (NP)'ün orta düzey konsantrasyonlarının, *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) (Cyprinidae)'den izole edilen hepatositlerde, apoptozis üzerine olan etkileri araştırıldı. Bu amaç doğrultusunda, EE₂ ve NP'nin 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonları hücrelere, 24 saat süre ile uygulandı. Daha sonra hücreler TUNEL ve propidyum iyodür ile boyandı ve apoptotik hücreler akım sitometrisi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre apoptotik hücre yüzdesinin her iki bileşimin bütün konsantrasyonlarında arttığı ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Öte yandan EE₂ ve NP'nin 10 μ M konsantrasyonunda, apoptotik hücre yüzdesinde, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı olma yönünde eğilim gösteren yükselişler gözlemlendi (sırasıyla; P = 0.08 ve P = 0.12). Elde edilen bulgular hem EE₂'nin hem de NP'nin balığın hepatositlerinde, karaciğer toksisitesi ile ilişki olarak, apoptozu uyarabilme potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: *Chalcalburnus tarichi*, apoptoz, hepatosit kültürü, akım sitometri 17 α -etinilestradiol, 4-*n*-nonilfenol

Effects of Intermediate Concentrations of 17 α -Ethinylestradiol and 4-*n*-Nonylphenol on Apoptosis in Primary Hepatocytes of *Chalcalburnus tarichi* (Pallas, 1811) (Cyprinidae)

Abstract

In the present study, the effects of intermediate concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE₂) and 4-*n*-nonylphenol (NP) on the apoptosis of hepatocytes isolated from *Chalcalburnus tarichi* were investigated. For this purpose, 0.1, 1, and 10 μ M concentrations of EE₂ and NP were applied to the cells for 24 h. Next, the cells were stained with terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling and

propidium iodide, and apoptotic cells were analyzed by flow cytometry. According to the results, the percentage of apoptotic cells increased with all of the concentrations of both compounds, although the increases were not statistically significant. However, there was a tendency toward a higher percentage of apoptotic cells when compared with the controls using 10 µM of EE₂ and NP (P = 0.08 and P = 0.12, respectively). The results showed that both EE₂ and NP possessed apoptosis-inducing potential in the hepatocytes of the fish, which was related with hepatotoxicity

Key words: *Chalcalburnus tarichi*, apoptosis, hepatocyte culture, flow cytometry, 17α-ethinylestradiol, 4-n-nonylphenol

Giriş

İnsanlar tarafından üretilen birçok kimyasal madde, doğal hormonlar gibi davranarak, hayvanlarda endokrin bozucu etkilere neden olabilmektedirler. Bunlar arasında pestisitler, poliklorlu bifeniller, alkilfenol etoksilatlar, sentetik farmasötikler gibi ziraatte, endüstride ve tıpta kullanılan kimyasallar sayılabilir (Colborn ve ark. 1993; L Brevini ve ark. 2005). Geçmişte yapılan çalışmalar, üreme ve gelişmeyi engelleyebilme yeteneğinde olan endokrin bozucu kimyasalların ve zenobiyotiklerin, sediment, yüzey suları ve göl gibi akuatik kompartmanlarda belirlendiğini göstermiştir (Kannan ve ark. 2003; Bursch ve ark. 2004). Dolayısıyla farklı akuatik ekosistemlerde yaşayan balıklar, bu kimyasalların hedef organizmaları arasındadırlar. Endokrin bozucu kimyasallara maruz kalma balıklarda, organlarda toksisiteye ve üreme fizyolojilerinde değişimlere yol açar (Weber ve ark. 2003). Balıkların endokrin bozuculara maruz kalması sonucunda meydana gelen değişimler arasında, ovotestis oluşumu (Jobling ve ark. 1998; Vigano ve ark. 2001; Kavanagh ve ark. 2004), steroid hormon seviyelerinde değişim (Villeneuve ve ark. 2002; Labadie ve Budzinski, 2006), erkek balıkta dişiye özgü vitellogenin (Sumpter ve Jobling, 1995; Jobling ve ark. 1998) ve zona radiata proteinlerinin üretilmesi (Arukwe ve ark. 1997; Fossi ve ark. 2004; Knoebel ve ark. 2004), feminizasyon (Sole ve ark. 2000), spermatogenezin bozulması (Kinnberg ve Toft, 2003), testis gelişimi ve olgunlaşmasında gecikme (Hassanin ve ark. 2002) ve düşük sperm sayısı (Haubruge ve ark. 2000) gibi anomaliler sayılabilir. Endokrin bozucu kimyasallardan olan 17α-etinilestradiol (EE₂), gebelik önleyici uygulamalarda kullanılan sentetik bir östrojendir, nonilfenol ise deterjan, plastik ve herbisitlerin üretiminde kullanılan, alkilfenol polietoksilatların bir indirgenme ürünüdür (Jobling ve Sumpter, 1993; Larsson ve ark. 1999). Hem EE₂ hem de NP, arıtma atık sularında, sedimentlerde ve akuatik çevrelerde belirlenmişlerdir (Ahel ve ark. 1994; Ternes ve ark. 1999; Kannan ve ark. 2003; Bursch ve ark., 2004). Dolayısıyla bu kimyasalların toksik etki mekanizmalarının bilinmesi çevre sağlığı açısından oldukça önemlidir.

Apoptoz, embriyonik morfogenez, metamorfoz ve hormon ile uyarılan dokuların şekillenmesi gibi temel biyolojik olaylarda rol oynayan, bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozdaki en karakteristik biyokimyasal özelliklerinden birisi DNA'nın, Ca²⁺-Mg²⁺ bağımlı endonükleaz aktivitesi sonucunda, internükleozomal bölgelerden düzenli olarak kesilmesi ve hücrede 180-200 baz çifti büyüklüğünde DNA fragmentlerinin oluşmasıdır. (Schwartzman ve Cidrowski, 1993). Endonükleaz aktivitesi ile oluşan kırık DNA 3'-OH uçlarının terminal transferaz enzimi ile işaretlenmesi ve işaretli bölgelerin biyotin avidin peroksidaz tekniği ile görünür hale getirilmesi (TUNEL tekniği),

apoptotik hücrelerin incelenmelerine olanak sağlar (Gavrieli ve ark. 1992). Apoptoz aynı zamanda, zenobiyotik stresine, hücrel fonksiyon/yapı kaybına ve organizmanın sağlığına ilişkin mekanistik bilgi sunan duyarlı ve faydalı bir biyomarkördür (Sweet ve ark. 1999).

Balık primer hepatosit kültürleri, ağır metallerin, zenobiyotiklerin ve hormonların etkilerini incelemek için geçmişten bu yana kullanılan faydalı tarama araçlarıdır (Bols ve ark. 2005). Bu çalışmada, Van Gölü Havzası'nda yaşayan ve Cyprinidae familyasına ait endemik bir tür olan inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811)'nden izole edilen ve primer kültürü yapılan hepatositler üzerinde, EE₂ ve NP'nin üç farklı otya düzey konsantrasyonlarının, 24 saatlik süre içindeki apoptozu uyarıcı etkilerinin, TUNEL yöntemi ve akım sitometri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

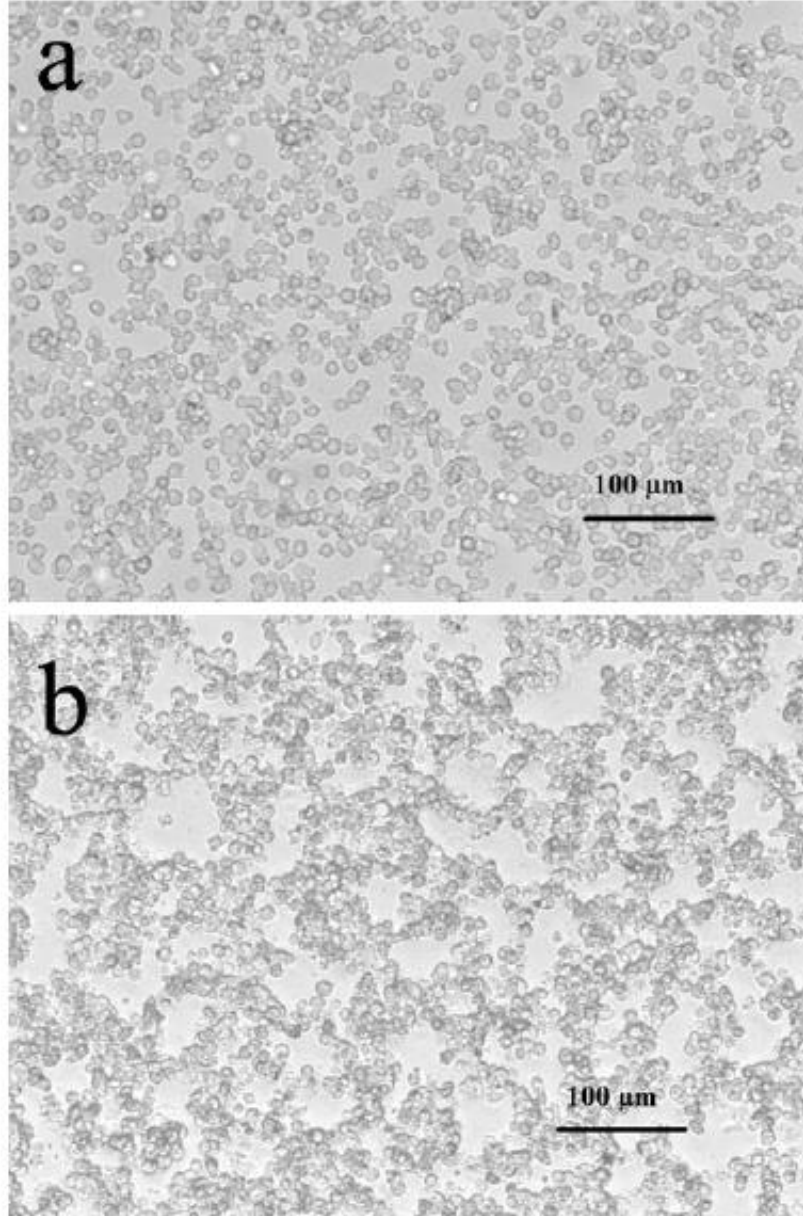
Balık temini

Çalışmada kullanılan inci kefalleri (ortalama çatal boy: 9.5 cm; ortalama total vücut ağırlığı: 8.5 g) Van Gölü'ne dökülen Karasu Çayı'ndan elektroşok ile yakalandıktan sonra 1000 l hacimli ve hava motorları ile havalandırılan fiberglas tanklara aktarıldı. Balıklar su sıcaklığının ortalama 16 °C olduğu tanklarda ve doğal fotoperiyot altında, bir ay aklimatizasyon sürecine bırakıldı. Bu süreç sırasında balıkların ticari alabalık yemine alıştırılması ve yem almaları sağlandı.

Hepatosit izolasyonu ve kültürü

İzolasyon öncesi bütün cam malzemeler ve cerrahi aletler kuru hava sterilizatöründe steril edildi (130 °C'de 2 saat). Ayrıca kullanılacak olan solüsyonlar ve medyum 0.22 µm por açıklığına sahip filtreden (MFS Advantec, ABD) geçirildi. Karaciğer hücre izolasyonu, Tollefsen ve ark. (2003) ve Mortensen ve ark. (2006)'ndan bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. Steril koşullarda balığın abdomen bölgesi açıldıktan sonra karaciğer dokusu çıkartıldı. Çıkartılan karaciğer, kalsiyumsuz NaCl (7.14 g/l), KCl (0.36 g/l), MgSO₄ (0.15 g/l), Na₂HPO₄ (1.6 g/l), NaH₂PO₄ (0.4 g/l), NaHCO₃ (0.31 g/l) ve EGTA (Etilen glikol tetra-asedik asit, Fluka, Kat. No: C3777, 20 mg/l) içeren solüsyon içerisine alınarak dokudan kan uzaklaştırılıncaya kadar oda sıcaklığında 10 dk yıkandı. Beyazlaşan karaciğer bu kez EGTA yerine CaCl₂ (0.22 g/l) ve kollajenaz (%15, Sigma-Aldrich, kat. no: C5138, Type IV) içeren aynı tampona alındıktan sonra ajite edildi. Karaciğer aynı solüsyon içinde yaklaşık 15 dk tritürasyon işlemine tabi tutuldu. Tritürasyon, önce, kesik uçlu mavi pipet ucu ile daha sonra mavi pipet ucu ile yapıldı. Bu işleme daha sonra sarı pipet ucu ve insülin enjektörüyle devam edilerek dokuya ait hücrelerin iyice ayrışması sağlandı. İşlem tamamlandıktan sonra, süspansiyon 100 g'de 3 dk. santrifüj edildi ve süpernatant içindeki kaba doku partikülleri pipetlendi. Pellet üzerine antibiyotik-antimikotik (% 1), NaHCO₃ (0.38 g/l) ve glutamin içeren serumsuz Leibovitz 15 (L-15, Sigma Kat. No: L1518) medyum eklendi. Hücreler tekrar süspansiyon edildikten sonra 60 g'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak üzerine L-15 eklendi ve santrifüj işlemi enzimin uzaklaşması için üç defa tekrarlandı. Tekrar süspansiyon edilen hücreler bu defa 30 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı ve izole edilen hücreler 1 ml medyum ile yeniden süspansiyon edildi. Hücre canlılığı, Tripkan mavisi eksklüzyon metodu kullanılarak yapıldı

ve solüsyon içindeki hücre canlılığının % 95'ten fazla olduğu belirlendi. Hücre süspansiyonunda ml'deki hücre sayısı belirlendikten sonra hücreler 48 kuyulu mikrolakanın (Greiner Bio-one, Cellstar, Kat. No: 677180) her kuyusunda 1×10^6 /ml hücre olacak şekilde L-15 içinde ekildi. Kültüre alınan hücreler daha sonra invert mikroskop (Leica DMI 6100) ile incelenerek görüntüleri alındı. Hücreler kimyasal uygulamasından önce O_2/CO_2 'siz steril inkübatörde 20 ± 1 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Karaciğer hepatositlerinin kültürden hemen sonraki (0. saat) ve 24 saat sonraki görüntüleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Hepatositlerin inkübasyondan 24 saat sonra, kord benzeri dizilim gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 1b).



Şekil 1. İnci kefalinde kültürü yapılan hepatositlerin görüntüleri. **a)** Kültüre alındıktan hemen sonra (0. saat) **b)** Kültüre alındıktan 24 saat sonra.

Kimyasal uygulama

Test kimyasalları olan 17 α -etinilestradiol (EE₂, saflık: \geq %98, Sigma) ve 4-*n*-nonilfenol (NP, saflık: %99, Riedel de H en), DMSO (Dimetil sülfoksit, Merck) içinde  oz ld kten sonra, 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde, kültür vasatına eklendi. Vasat içindeki DMSO konsantrasyonu, %0.1'i geçmeyecek şekilde ayarlandı. Kuyulara ekilen hücrelerin üzerindeki vasat alınarak EE₂ ve NP'nin 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarını içeren vasat ile değiştirildi. Kontrol grubuna ait kuyudan alınan vasat ise sadece L15 ile değiştirildi. Her grup için iki tekrar yapıldı. Hücreler, O₂/CO₂'siz steril inkübatörde 20 \pm 1 $^{\circ}$ C'de 24 saat kimyasallara maruz bırakıldı.

Hücre süspansiyonunda TUNEL ve propidyum iyodür duple boyaması

Kimyasal uygulaması tamamlandıktan sonra, hücreler pipetlenerek kaldırıldı ve buldukları vasat içinde bir ependorf tüpe alınarak süspanse edildi. Hücre süspansiyonundaki apoptotik hücreler, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi ile işaretlendi. TUNEL boyama, ticari kit (Fluorescein FragELTM DNA Fragmentation Detection Kit, Kat. No: QIA39, Calbiochem, Merck, ABD) kullanarak ve kit prokollerine uyularak yapıldı. Süspanse edilen hücreler, 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra L-15 pipetlendi. Hücreler PBS ile hazırlanan %4'lük formalin ile 10 dk tespit edildikten sonra 1000 rpm'de 5 dk tekrar santrifüj edildi. Fiksatif pipetlenerek alındı ve hücreler %80'lik etanol ile tekrar süspanse edildi. Santrifüj edilen süspansiyon pipetlendikten sonra tris tuz tamponu (TBS; 20 mM Tris pH: 7.6, 140 mM NaCl) ile süspanse edilerek oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. Hücreler, santrifüjleme basamağından sonra proteinaz K (10mM Tris'de, pH:8, 2 mg/ml) ile oda sıcaklığında 5 dk muamele edildi. Süspansiyon santrifüjlenip proteinaz K uzaklaştırıldıktan sonra TdT tamponu (1 M Sodyum kakodilat, 0.15 M Tris, 1.5 mg/ml BSA, 3.75 mM CoCl₂, pH: 6.6) ile tekrar süspanse edilen hücreler oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon tamamlandıktan sonra süspansiyon santrifüj edilerek TdT tamponu uzaklaştırıldı ve hücreler floresan (FITC) işaretle deoksinekletidler ve TdT enzimini (3 μ l enzim, 57 μ l TdT işaretleme karışımı) içeren karışım ile 37 $^{\circ}$ C'de karanlık ortamda 60 dk inkübe edildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra süspansiyon santrifüj edilerek, işaretleme karışımı uzaklaştırıldı. Hücreler, TBS ile muamele edildikten sonra santrifüj edildi ve TBS ile iki defa daha yıkandı. Daha sonra hücreler, 0.5 ml TBS'de tekrar süspanse edildi. Son olarak süspansiyona propidyum iyodür (PI, 2 μ g/ml) eklendi ve zıt boyama yapıldı. Pozitif kontroller, proteinaz K uygulamasından sonra, süspansiyon DNaz-I (TBS ile hazırlanan 1mM MgSO₄'de 1 μ g/ μ l, Kat. No: A3778, AppliChem) enzimi ile oda sıcaklığında 20 dk inkübasyonu ile yapıldı. Negatif kontroller de ise işaretleme karışımına, TdT enziminin yerine bidistile su bırakıldı. Diđer basamaklar her iki kontrolde de yukarıda tarif edildiği gibi gerçekleştirildi.

Akım sitometri ile apoptotik hücre sayımı

EE₂ ve NP'ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefali hepatositlerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümünün kantifikasyonu, TUNEL metodu ile işaretlenen hücrelerin akım sitometri cihazı (Coulter Epics XL) kullanılarak ölümü sonucunda yapıldı. Hücreler TUNEL-PI duple

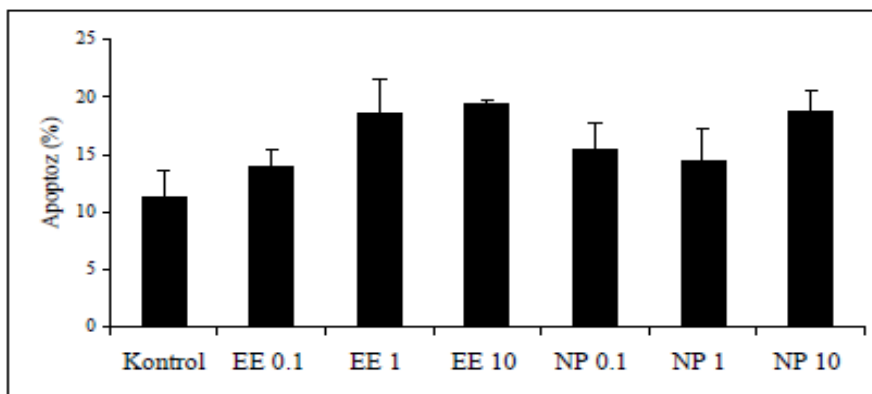
boyamasından sonra yeşil floresan (FITC, apoptotik DNA fragmentasyonunu belirtmektedir) ve kırmızı (PI, total DNA miktarını belirtmektedir) floresanda analiz edildi. Hücre sayımında ortak pozitif (FITC⁺/PI⁺) hücreler, apoptotik olarak tanımlandı. Daha sonra total hücre popülasyonu (FITC⁺/PI⁺ ve FITC⁻/PI⁺; apoptotik ve apoptotik olmayan hücrelerin toplamı) içerisinde apoptotik hücre yüzdesi, hesaplandı. FITC⁻/PI⁻ gibi boyanmayan yapılar hücre kalıntısı olarak, FITC⁺/PI⁻ gibi boyanan yapılar ise artefakt olarak kabul edildi ve sayıya dahil edilmedi. Her örnek için en az 2000 hücre sayıldı.

İstatistiksel analizler

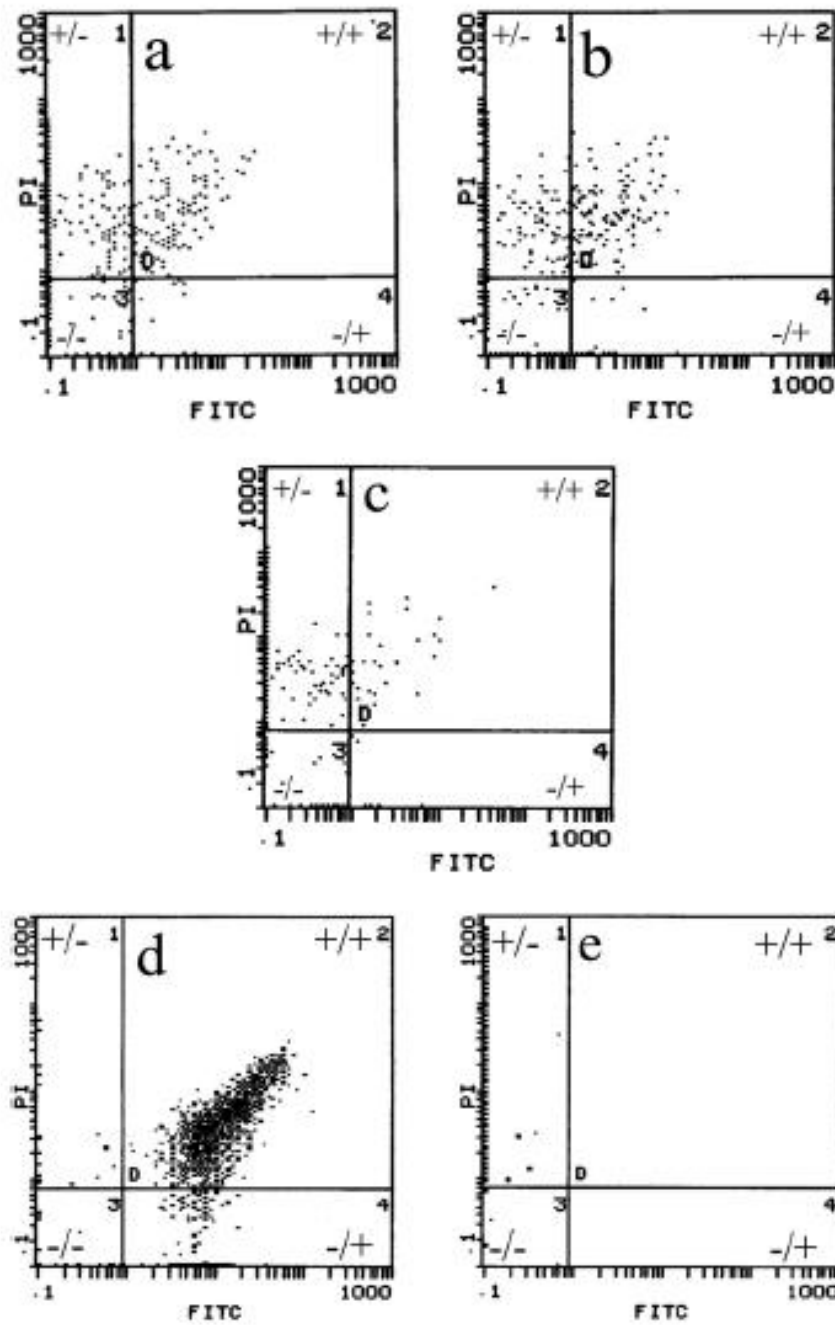
Bütün istatistiksel analizler “SPSS 11.5 for Windows” programı kullanılarak yapıldı. Akım sitometri analizleri sonucu elde edilen veriler, ANOVA’ya tabi tutulduktan sonra Dunnett’s testi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standart hata (ort \pm sh) olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık seviyesi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

Bulgular

EE₂ ve NP’nin 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılan hepatositlerde meydana gelen apoptoz yüzdesinde artışlar gözlenmesine rağmen, bu artışların kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları belirlendi (Şekil 2). Bununla birlikte EE₂ ve NP’nin 10 μ M konsantrasyonunda, apoptoz yüzdesindeki artışlara ait istatistiksel anlamlılık derecelerinin sırasıyla $P = 0.08$ ve $P = 0.12$ olduğu belirlendi. Dolayısıyla her iki kimyasalın 10 μ M konsantrasyonunda apoptoz yüzdesinde meydana gelen yükselişte, istatistiksel anlamlılığa doğru bir eğilimin olduğu tespit edilmiştir. EE₂ ve NP’nin 10 μ M konsantrasyonlarına 24 saat boyunca maruz bırakılan inci kefalı hepatositlerinde meydana gelen apoptotik hücre ölümünün akım sitometri ile ölçümlerine ait histogram görüntüleri Şekil 3’de gösterilmiştir. Buna göre hepatosit apoptozunun kontrol grubuna göre, belirgin bir şekilde arttığı görülmektedir (sağ üst paneller).



Şekil 2. EE₂ ve NP’ye 24 saat boyunca 0.1, 1 ve 10 μ M konsantrasyonlarda maruz bırakılan inci kefalı karaciğer hücrelerinde apoptoz yüzdesi. Değerler her grup için birbirinden bağımsız üç deneyin ($n = 3$) ort \pm sh’sı olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3. EE₂ (a) ve NP (b)'nin 10 µM konsantrasyonlarına maruz bırakılan inci kefali hepatositlerinde, kontrol grubu hücrelerinde (c), pozitif kontrol hücrelerinde (d) ve negatif kontrol hücrelerinde (e), akım sitometri analizi sonucunda elde edilen histogramlar. Histogramlarda sağ üst kareler, apoptotik hücreleri (+/+; PI⁺/ FITC⁺); sol üst kareler apoptotik olmayan hücreleri, (+/-; PI⁺/ FITC⁻); sol alt kareler boyanmayan yapıları, (-/-; PI⁻/ FITC⁻); sağ alt kareler ise artefakt yapılarını (-/+; PI⁻/ FITC⁺), göstermektedir. EE₂ ve NP'nin 10 µM konsantrasyonlarına maruz bırakılan hepatositlere ait histogramların sağ üst panellerinde görüldüğü gibi apoptoz, belirgin bir şekilde artmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, EE₂ ve NP'nin üç farklı konsantrasyonuna (0.1, 1 ve 10 µM), 24 saat boyunca maruz bırakılan inci kefali hepatositlerinde, apoptotik hücre yüzdesinin arttığı gözlemlendi ancak bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Rat hepatositlerinde EE₂'nin 2 saatlik LC50 değerinin 150 ± 8 µmol/l olduğu belirlenmiştir (Wan ve O'Brien, 2014). EE₂'nin 1 ve 10 µM konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan insan A375 melanoma hücrelerinde apoptotik hücre yüzdesinin her iki konsantrasyonda anlamlı olarak arttığı ancak B164A5 murin melanoma hücrelerinde sadece 10 µM konsantrasyonda anlamlı artışın olduğu belirlenmiştir (Coricovac ve ark. 2018). Serumsuz medyunda NP'ye 0, 0.01, 0.1, 1 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda maruz bırakılan PC12 hücrelerinde meydana gelen apoptozda artış olduğu ancak bu artışın 1 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarda anlamlı olduğu belirtilmiştir (Aoki ve ark. 2004). Başka bir çalışmada ise NP'nin 0.1, 1 ve 10 µM konsantrasyonlarına 2, 4 ve 6 saat boyunca maruz bırakılan timositlerde, apoptozun sadece 4. ve 6. saatlerde anlamlı derecede arttığı bildirilmiştir (Yao ve ark. 2006). Bu çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak, NP'nin 0.5 ile 50 µM konsantrasyon aralığına, 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) epidermal hücrelerinde ve sazan balığı (*Cyprinus carpio*)'na ait deri tümöründen izole edilen epidermal hücre hattında, apoptozun, sadece 50 µM NP konsantrasyonunda anlamlı olarak arttığı, 10 µM NP konsantrasyonunda ise apoptotik hücre sayısında anlamlı bir artış olmadığı belirlenmiştir (Lamche ve Burkhardt-Holm, 2000). Dolayısıyla, EE₂ ve NP'nin apoptozu uyarıcı etkilerinin, hücre tipine, uygulama süresine ve uygulama konsantrasyonuna bağlı olarak değişebildiği söylenilebilir. Bu çalışmada EE₂ ve NP'nin 10 µM'lık konsantrasyonları, apoptotik hücre yüzdesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırmamış olsalar bile bu yönde eğilim gösterdikleri gözlemlendi (P değerleri sırasıyla; 0.08 ve 0.12). Bu nedenle, her iki kimyasalın inci kefali karaciğer hepatositlerinde apoptozu uyarıcı potansiyele sahip oldukları ifade edilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2007-FED-B42). Desteğinden dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M. (1994). Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment-I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. *Water Research*, 28, 1131-1142.
- Aoki, M., Kurasaki, M., Saito, T., Seki, S., Hosokawa, T., Takahashi, Y., Fujita, H., Iwakuma, T. (2004). Nonylphenol Enhances Apoptosis Induced by Serum Deprivation in PC12 Cells. *Life Sciences*, 74, 2301-2312.
- Arukwe, A., Förlin, L., Goksöyr, A. (1997). Xenobiotic and Steroid Biotransformation Enzymes in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Liver Treated with an Estrogenic Compound, 4-Nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 2576-2583.
- Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., Schirmer, K. (2005). Use of fish Cell Lines in the Toxicology and Ecotoxicology of Fish. Piscine cell lines in environmental

- toxicology. In: Mommsen, T. P., Moon, T. W., (editors). *Biochemistry and molecular biology of fishes*. Elsevier B. V., Amsterdam, vol.: 6, p. 43–84.
- Bursch, W., Fuerhacker, M., Gemeiner, M., Grillitsch, B., Jungbauer, A., Kreuzinger, N., Moesti, E., Scharf, S., Schmid, E., Skutan, S., Walter, I. (2004). Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: The Austrian Approach-ARCEM. *Water Science Technology*, 50, 293-300.
- Colborn, T., Vom Saal, F. S., Soto, A. M. (1993). Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378-384.
- Coricovac, D., Farcas, C., Nica, C., Pinzaru, I., Simu, S., Stoian, D., Soica C., Proks M., Avram S., Navolan D., Dumitru C., Popovici., R. A., Dehelean C. A., Dumitru, C. (2018). Ethinylestradiol and Levonorgestrel as Active Agents in Normal Skin, and Pathological Conditions Induced by UVB Exposure: In vitro and In ovo Assessments. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3600.
- Fossi, M. C., Casini, S., Marsili, L., Ancora, S., Mori, G., Neri, G., Romeo, T., Ausili, A. (2004). Evaluation of Ecotoxicological Effects of Endocrine Disrupters During a Four-Year Survey of the Mediterranean Population of Swordfish (*Xiphias gladius*). *Marine Environmental Research*, 58, 425-429.
- Gavrieli, Y., Sherman Y., Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labelling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119, 493-501.
- Hassanin, M., Kuwahara, S., Nurdihayat, Tsukamoto, Y., Ogawa, K., Hiramatsu, K., Sasaki, F. (2002). Gonadosomatic Index and Testis Morphology of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Rivers Contaminated with Estrogenic Chemicals. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 921-926.
- Haubruege, E., Petit, F., Cage, M. J. G. (2000). Reduced Sperms Counts in Guppies (*Poecilia reticulata*) Following Exposure to Low Levels of Tributyltin and Bisphenol A. *Proceedings of the Royal Society of London*, 267, 2333-2337.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G., Sumpter, J. P. (1998). Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science and Technology*, (32), 2498-2506.
- Jobling, S., Sumpter, J. P. (1993). Detergent Components in Sewage Effluent are Weakly Oestrogenic to Fish: An in vitro Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27, 361-372.
- Kannan, K., Keith, T. L., Naylor, C. G., Staples, C. A., Snyder, S. A., Giesy, J. P. (2003). Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Fish, Sediment, and Water from the Kalamazoo River, Michigan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 77-82.
- Kavanagh, R. J., Balch, G. C., Kiparissis, Y., Nimi, A. J., Sherry, J., Tinson, C., Metcalfe, C. D. (2004). Endocrine Disruption and Altered Gonadal Development in White Perch (*Morone americana*) from the Lower Great Lakes Region. *Environmental Health Perspectives*, 112, 898-902.
- Kinnberg, K., Toft, G., (2003). Effects of Estrogenic and Androgenic Compounds on the Testis Structure of the Adult Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 16-24.
- Knoebel, I., Hemmer, J. H., Denslow, N. D. (2004). Induction of Zona Radiata and Vitellogenin Genes in Estradiol and Nonylphenol Exposed Male Sheepshead

- Minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Environmental Research*, 58, 547-551.
- Labadie, P., Budzinski, H. (2006). Alteration of Steroid Hormone Profile in Juvenile Turbot (*Psetta maxima*) as a Consequence of Short-Term Exposure to 17 α -Ethinylestradiol. *Chemosphere*, 64, 1274-1286.
- Lamche, G., Burkhardt-Holm, P. (2000). Changes in Apoptotic Rate and Cell Viability in Three Fish Epidermis Cultures after Exposure to Nonylphenol and to a Wastewater Sample Containing Low concentrations of Nonylphenol. *Biomarkers*, 5(3), 205-218.
- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersen, M., Berg, A. H., Olsson, P. E., Förlin, L. (1999). Ethinylestradiol-an Undesired Fish Contraceptive?. *Aquatic Toxicology*. 45, 91-97.
- L Brevini, T. A., Zanetto, S. B., Cillo, F. (2005). Effects of Endocrine disruptors on Developmental and Reproductive Functions. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine and Metabolic Disorders*, 5(1), 1-10.
- Mortensen, A. S., Tolfen, C. C., Arukwe, A. (2006). Gene Expression Patterns in Estrogen (Nonylphenol) and Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists (PCB-77) Interaction Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Primary Hepatocyte Culture. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69, 1-19.
- Schwartzman, R. A., Cidlowski, J. A. (1993). Apoptosis: The Biochemistry and Molecular Biology of Programmed Cell Death. *Endocrinology*, (14), 133-151.
- Sole, M., Porte, C., Barceló, D. (2000). Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17 α -Ethinylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 494-500.
- Sumpter, J. P., Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, 173-178.
- Sweet, L. I., Passino-Reader, D. R., Meier, P. G., Omann, G. M. (1999). Xenobiotic-Induced Apoptosis: Significance and Potential Application as a General Biomarker of Response. *Biomarkers*, 4, 237-253.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R. D., Servos, M. (1999). Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants. I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Science of the Total Environment*, 225, 81-90.
- Tollefsen, K. E., Mathisen, R., Stenersen, J. (2003). Induction of Vitellogenin Synthesis in An Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Hepatocyte Culture: A Sensitive *in vitro* Bioassay for the Oestrogenic and Anti-oestrogenic Activity of Chemicals. *Biomarkers*, 8, 394-407.
- Vigano, L., Arillo, A., Bottero, S., Massari, A., Mandich, A. (2001). First Observation of Intersex Cyprinids in the Po River (Italy). *Science of the Total Environment*, 269, 189-194.
- Villeneuve, D. L., Villalobos, S. A., Keith, T. L., Snyder, E. M., Fitzgerald, S. D., Giesy, J. P. (2002). Effects of Waterborne Exposure to 4-Nonylphenol on Plasma Sex Steroid and Vitellogenin Concentrations in Sexually Mature Male Carp (*Cyprinus Carpio*). *Chemosphere*, 47, 15-28.

- Wan, L., O'Brien, P. (2014). Molecular mechanism of 17 α -Ethinylestradiol Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes. *Canadian journal of Physiology and Pharmacology*, 92(1), 21-26.
- Weber, L. P., Hill, Jr, R. L., Janz, D. M. (2003). Developmental Estrogenic Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological Evaluation of Gametogenesis and Organ Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 63, 431-446.
- Yao, G., Yang, L., Hu, Y., Liang, J., Hou, Y. (2006). Nonylphenol-Induced Thymocyte Apoptosis Involved Caspase-3 Activation and Mitochondrial Depolarization. *Molecular Immunology*, 43(7), 915-926.