

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE
GENOTOKSİK ve ÖSTROJEN-İLİŞKİLİ RESEPTÖR (*ERR*) GEN
İFADESİNE ETKİSİ**

AYGÜL KILIÇ KARABULUT

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

OCAK, 2015

Tezin Başlığı: **Bazı Çevresel Kirleticilerin *Drosophila melanogaster*' de Genotoksik ve Östrojen-İlişkili Reseptör (ERR) Gen İfadesine Etkisi**

Tezi Hazırlayan: **Aygül KILIÇ KARABULUT**

Sınav Tarihi: 09.01.2015

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Prof.Dr.Elif YEŞİLADA

İnönü Üniversitesi

Prof.Dr.Mahmut ÇALIŞKAN

İstanbul Üniversitesi

Prof.Dr.Murat ÖZMEN

İnönü Üniversitesi

Prof.Dr.Dilek ASMA

İnönü Üniversitesi

Doç.Dr.Abbas GÜNGÖRDÜ

İnönü Üniversitesi

Prof.Dr.Alaaddin ESEN

Enstitü Müdürü V.

Onur Sözü

Doktora tezi olarak sunduğum “**Bazı Çevresel Kirleticilerin *Drosophila melanogaster*’de Genotoksik ve Östrojen-İlişkili Reseptör (*ERR*) Gen İfadesine Etkisi**” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların hem metin içinde hem de kaynaklar bölümünde yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Aygül KILIÇ KARABULUT

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI ÇEVRESEL KİRLETİCİLERİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE GENOTOKSİK ve ÖSTROJEN-İLİŞKİLİ RESEPTÖR (*ERR*) GEN İFADESİNE ETKİSİ

Aygül KILIÇ KARABULUT

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

104 + x sayfa

2015

Danışman: Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Evsel, endüstriyel ya da zirai uygulamalar sonucu çevrede yüksek konsantrasyonlarda bulunan kimyasallar, ciddi boyutlarda çevreyi tehdit ederek gerek sucul, gerekse karasal canlılar üzerinde pek çok olumsuz etkiye neden olmaktadır. Bu bakımdan çevresel kimyasalların genotoksik etkilerinin bilinmesi büyük önem taşımaktadır. Kimyasalların genotoksik aktivitelerini belirlemek için çok çeşitli testler bulunmaktadır, ancak bunların arasında “*Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)” sağladığı pek çok avantaj nedeniyle en çok tercih edilen testlerden biridir. Özellikle sahip olduğu enzim sistemleri ve genetik mekanizmaları *Drosophila melanogaster*'i kimyasalların genotoksik aktivitelerini belirlemek için mükemmel bir model organizma yapmaktadır.

Bu çalışmada çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan bazı çevresel kimyasalların olası genotoksik etkilerinin *in vivo* bir test olan SMART ile araştırılmasının yanı sıra, bu kimyasalların *D. melanogaster* östrojen-ilişkili reseptör (*ERR*) gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmanın ilk bölümünde, çevresel kimyasalların (Bisfenol A (BFA), Nonilfenol (NF), Dietilstilbestrol (DES), 17- β östradiol (E2), Tribütülin (TBT) ve Methidatyon (MD)), genotoksik etkileri, bu kimyasalların çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan larvalardan gelişen ergin bireylerde araştırıldı. Bu amaçla trans-heterozigot bireylerin kanatları *mwh* ve/veya *flr* beneklerinin varlığı için ışık mikroskobu altında 400X büyütmeyle tarandı. Bu benekler, mitotik rekombinasyon ya da mutasyon (delesyon, nokta mutasyon, translokasyonun spesifik tipleri vs.) gibi farklı genotoksik olaylar nedeniyle

oluşabilmektedir. Çalışmanın ikinci bölümünde çevresel kimyasalların farklı konsantrasyonlarının, *D. melanogaster*'de *ERR* genlerinin mRNA düzeyleri üzerine etkisi gerçek zamanlı PZR kullanılarak araştırıldı. Gen ifadelerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi yapılarak, gen ifadesi düzeyindeki göreceli farklılıklar belirlendi.

Çalışma sonucunda BFA, NF, DES, TBT ve MD'nin *Drosophila*'da *ERR* gen ifadesini etkilediği gözlemlendi. SMART'tan elde edilen sonuçlar ise BFA, NF, DES, E2 ve MD'nin *Drosophila*'da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığını, TBT'nin en yüksek konsantrasyonunun genotoksik etkilere neden olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila melanogaster*, SMART, Genotoksisite, Endokrin Bozucular (EB), Çevresel Kimyasallar, Östrojen-ilişkili Reseptör Gen (*ERR*).

ABSTRACT

PhD. Thesis

EFFECTS OF SOME ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ON GENOTOXIC AND ESTROGEN-RELATED RECEPTOR (*ERR*) GENE EXPRESSION ON *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Aygül KILIÇ KARABULUT

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

104 + x pages

2015

Supervisor: Prof. Elif YEŞİLADA (PhD)

Chemicals that are found in high concentrations in the environment due to domestic, industrial or agricultural applications seriously threaten the environment and cause many negative effects on aquatic and terrestrial creatures. From this aspect, it is very important to know the genotoxic effects of environmental pollutants. There are various tests for determining the genotoxic activities of chemicals however “*Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test (SMART)” is the most preferred one among the others due to many advantages it provides. Especially its enzyme systems and genetic mechanisms make *Drosophila melanogaster* a perfect model organism for determination of genotoxic activities of chemicals.

In this study, the research regarding many prevalent environmental pollutants (Bisphenol A (BPA), Nonylphenol (NP), Diethylstilbestrol (DES), 17- β estradiol (E2), Tributyltin (TBT) and Methidathion (MD)), used in various fields by an *in vivo* test named SMART and also regarding the effect of these chemicals on the estrogen-related receptor (*ERR*) gene expression of *D. melanogaster* was conducted. In the first section of the study, the genotoxic effects of environmental chemicals were researched on mature individuals developed from larvae exposed to various concentrations of these chemicals. In the genotoxicity and antigenotoxicity studies, the wings of the trans-heterozygous flies were scored under 400X magnification for

the presence of *mwh* and/or *flr* spots. These spots can be due to different genotoxic events such as mitotic recombination or mutation (deletion, point mutation, specific types of translocation, etc.)

In the second section of the study, we studied by using real time PCR to evaluate the effects of environmental chemicals on the expression of *ERR* gene of *D. melanogaster*.

The results of this study showed that BPA, NP, DES, TBT and MD influence the expression of *ERR* in *D. melanogaster*. The results obtained from SMART showed that BFA, NF, DES, E2 and MD didn't cause genotoxic effect on *Drosophila* while the highest concentration of TBT caused genotoxic effects.

KEYWORDS: *Drosophila melanogaster*, SMART, Genotoxicity, Endocrine disrupters (EDs), Environmental chemicals, Estrogen-related Receptor Gene (*ERR*).

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasında ve hazırlanmasında gerek deneysel gerekse teorik çalışmalarımın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya;

Projeyi (2011/71) destekleyen İnönü Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Projeleri Yönetim Birimi'ne;

Çalışmalarım sırasında her türlü yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Sayın Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye;

Ve...

Tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan, bana olan desteklerini, güvenlerini ve sonsuz sevgilerini hep üzerimde hissettiğim, varlıklarıyla benim daha güçlü olmamı ve hayata daha sıkı tutunmamı sağlayan canım annem, babam ve kardeşime;

Sonsuz sevgisi, güveni ve desteğiyle her zaman yanımda olan biricik eşime;

en içten dileklerimle teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Endokrin Bozucu Kimyasallar	2
1.2. Endokrin Bozucu Kimyasalların Etki Mekanizması	3
1.3. Östrojen Hormonunun Etki Mekanizması ve Östrojen Reseptörleri	4
1.4. Endokrin Bozucuların Östrojenik Etkisi ve Östrojenle İlişkili Reseptörler....	5
1.5. <i>Drosophila melanogaster</i> Nükleer Reseptörleri	7
1.6. Bisfenol A (BFA)'nın Yapısı	9
1.6.1. BFA'nın Kullanımı ve Çevresel Durumu.....	9
1.6.2. BFA'nın Endokrin Bozucu Etkisi.....	11
1.7. Nonilfenol (NF)'ün Yapısı.....	12
1.7.1. NF'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu.....	13
1.7.2. NF'nin Endokrin Bozucu Etkisi.....	14
1.8. Tribütiltin (TBT)'in Yapısı.....	15
1.8.1. TBT'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu.....	16
1.8.2. TBT'nin Endokrin Bozucu Etkisi.....	17
1.9. Methidatyon (MD)'un Yapısı.....	18
1.9.1. MD'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu.....	19
1.10. Dietilstilbestrol (DES)'ün Yapısı.....	20
1.10.1. DES'in Kullanımı ve Endokrin Bozucu Etkisi.....	20
1.11. 17β-östradiol (E2)'ün Yapısı ve Etkisi.....	21
1.12. Genetik Toksikoloji.....	23
1.13. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	24
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
2.1. <i>Drosophila</i> Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	29
2.2. Çalışmada Kullanılan Çevresel Kimyasallar ile İlgili Yapılan Toksisite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	31
2.3. Çalışmada Kullanılan Çevresel Kimyasalların Östrojenik Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	35
3. MATERYAL ve YÖNTEM	37
3.1. Kullanılan Organizma ile İlgili Genel Bilgiler.....	37
3.1.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü.....	38
3.2. Çalışmada Kullanılan <i>Drosophila</i> Stoklarının Genetiksel Özellikleri.....	41
3.3. Çalışmada Kullanılan Çapraz.....	41
3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
3.4.1. Deney Koşulları.....	42
3.4.2. Besiyerinin Hazırlanışı.....	42
3.4.3. Bayıltma Yöntemi.....	44
3.4.4. Standart Çapraz için Ergin Bireylerin Seçimi ve Larva Toplanması İşlemleri	44
3.4.5. Mutajen ve Çevresel Kimyasal Çözeltilerinin Hazırlanması ve Besiyerine Eklenmesi.....	45
3.5. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması.....	45
3.5.1. Ergin Bireylerin Toplanarak, Kanat Preparatlarının Hazırlanması.....	46

3.5.2.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi.....	47
3.6.	Çevresel Kimyasalların <i>ERR</i> Gen İfadesi Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik Çalışmalar.....	48
3.6.1.	RNA Saflaştırılması için Larva Toplanması.....	48
3.6.2.	Toplam RNA Saflaştırılması.....	48
3.6.3.	cDNA Sentez Protokolü.....	49
3.6.4.	Gerçek Zamanlı PZR Protokolü.....	50
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1.	Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular.....	51
4.1.1.	Mitomisin C'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	51
4.1.2.	Çevresel Kimyasalların Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	53
4.1.2.1.	Etanol'ün Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	53
4.1.2.2.	DMSO'nun Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	54
4.1.2.3.	BFA'nın Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	55
4.1.2.4.	NF'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	56
4.1.2.5.	DES'in Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	58
4.1.2.6.	E2'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	60
4.1.2.7.	TBT'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	62
4.1.2.8.	MD'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması.....	63
4.2.	Çevresel Kimyasalların <i>ERR</i> Gen İfadesi Üzerine Etkisinin Araştırılması....	65
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ	71
5.1.	Çevresel Kimyasalların Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	71
5.1.1.	MMC'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	72
5.1.2.	Etanol ve DMSO'nun Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	73
5.1.3.	BFA'nın Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	74
5.1.4.	NF'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	75
5.1.5.	DES'in Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	76
5.1.6.	E2'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	77
5.1.7.	TBT'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	77
5.1.8.	MD'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi.....	78
5.2.	Çevresel Kimyasalların <i>ERR</i> Gen İfadesi Üzerine Etkisi.....	80
5.2.1.	Etanol ve DMSO'nun <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Gen İfadesi Üzerine Etkisi.....	80
5.2.2.	BFA'nın <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	81
5.2.3.	NF'nin <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	82
5.2.4.	DES'in <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	83
5.2.5.	E2'nin <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	84
5.2.6.	TBT'nin <i>ERRA</i> ve <i>ERRB</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	84
5.2.7.	MD'nin <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi.....	85
6.	KAYNAKLAR	88
	ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Bisfenol A'nın moleküler yapısı.....	9
Şekil 1.2.	Nonilfenol'ün moleküler yapısı.....	12
Şekil 1.3.	Tribütülin klorid (TBTCI)'in moleküler yapısı.....	15
Şekil 1.4.	Dietilstilbestrol'ün moleküler yapısı.....	20
Şekil 1.5.	17 β -östradiol'ün moleküler yapısı.....	22
Şekil 1.6.	Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar.....	27
Şekil 3.1.	<i>Drosophila</i> 'nın yaşam döngüsü.....	39
Şekil 4.1.	Mitomisin C (MMC) uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.2.	BFA uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.3.	NF uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	58
Şekil 4.4.	Dietilstilbestrol uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.5.	17 β -östradiol uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	61
Şekil 4.6.	Tribütülin uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	63
Şekil 4.7.	Methidatyon uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.8.	<i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizi. <i>Gapdh 1 A</i> , <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR sonucu oluşan eğrileri.....	66
Şekil 4.9.	<i>ERR A</i> , <i>ERR B</i> ve <i>Gapdh1 A</i> cDNA'larının PZR sonucu oluşan ürünlerinin agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	BFA'nın bazı kimyasal özellikleri	9
Çizelge 1.2.	Nonilfenol'ün bazı kimyasal özellikleri	12
Çizelge 1.3.	TBTCl'nin bazı kimyasal özellikleri	16
Çizelge 3.1.	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri için gerekli olan malzemeler ve miktarları	42
Çizelge 3.2.	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri için gerekli olan asit karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları	43
Çizelge 3.3.	Faure çözeltisi için gerekli malzemeler ve miktarları	46
Çizelge 3.4.	<i>Gapdh1 A</i> , <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> genlerine ait primer dizileri ve gerçek zamanlı PZR sonucu oluşması beklenen ürün büyüklükleri.....	50
Çizelge 4.1.	MMC gruplarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	52
Çizelge 4.2.	Etanol grubunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler	53
Çizelge 4.3.	DMSO grubunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	54
Çizelge 4.4.	BFA dozlarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	55
Çizelge 4.5.	NF dozlarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	57
Çizelge 4.6.	DES dozlarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	59
Çizelge 4.7.	E2 dozlarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	61
Çizelge 4.8.	TBT dozlarında <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	62
Çizelge 4.9.	MD dozlarından elde edilen <i>Drosophila</i> kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler.....	64
Çizelge 4.10	BFA, NF, DES, E2, TBT ve MD'nin <i>ERR A</i> ve <i>ERR B</i> genlerinin ifadesi üzerine rölatif etkisi.....	67

SİMGELER ve KISALTMALAR

SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı mutasyonunu tasır
<i>flr³</i>	Flare mutasyonunu tasır, <i>flr3</i> kanat kıllarının seklini etkileyen resesif bir mutasyondur
MMC	Mitomisin C
BFA	Bisfenol A
NF	Nonilfenol
DES	Dietilstilbestrol
E2	17 β -estradiol
TBT	Tribütiltin
MD	Methidatyon
DMSO	Dimetilsülfoksit
ER	Östrojen Reseptörü
ERR	Östrojen-ilişkili Reseptör

1. GİRİŞ

Organizmalar yaşadığı çevrede yaşamını olumsuz etkileyen birçok zararlı bileşiğe hava, su, toprak veya besin gibi çeşitli yollarla maruz kalmaktadır (Clotfelter vd., 2004; Erhard ve Rhind, 2004). Evsel, endüstriyel ya da zirai uygulamalar sonucu çevreye verilen bu maddeler gerek suçul, gerekse karasal canlıları olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Özellikle kimya endüstrisinin gelişimine paralel olarak ekonominin büyümesiyle birlikte, endüstride kullanılan kimyasallara olan talep giderek artmaktadır. Üretimlerinde artış olan bu maddeler, ciddi boyutlarda çevreyi tehdit ederek, insan ve hayvan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Wang, 2012). Bu bağlamda, birçok maddenin endokrin sistemin normal fonksiyonunu bozarak, endokrin bozucu özellik gösterdiği, üremeyi azalttığı, gelişmeyi etkilediği ve bağışıklık sistemini zayıflattığı bilinmektedir (Newman, 2013; Quignot vd., 2012).

Büyük miktarlarda çevreye verilen ve ihmal edilen kirleticilere örnek olarak; bromlu alev geciktiriciler, klorlama yan ürünleri, florlu kimyasallar, sentetik östrojenler, hayvansal ürünlerden gelen hormonlar, alkil fenol etoksilatlar ve parçalanma ürünleri, sentetik antimikrobiyal ürünler, farmasötikler, kişisel bakım ürünlerinin bileşenleri, ağır metaller, pestisitler, organotinler ve deterjanlar verilebilir (Göktekin and Barlas, 2008; Newman, 2013).

UNEP/WHO 2012 raporuna göre, 800'e yakın kimyasalın hormon sentezi, dönüşümü ve reseptörleri ile etkileşim içerisinde bulunduğu bilinmesine rağmen bunlardan çok azının bir organizmadaki endokrin etkileri araştırılmıştır. Günümüzde ticari olarak kullanımda olan bu kimyasalların büyük çoğunluğu hiçbir şekilde test edilmemiştir. Bu bağlamda, çalışma kapsamında farklı gruplardan olan çeşitli çevresel kimyasalların olası genotoksik etkilerinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılması yanında, bu kimyasalların olası endokrin bozucu etkilerini belirlemek için *Drosophila melanogaster* östrojenle ilişkili reseptör (*ERR*) (estrogen-related receptor) geninin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amaçlanmıştır. Bu amaçla sağladığı birçok avantaj nedeniyle model organizma olarak *D. melanogaster* seçilmiştir. Özellikle son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir (Morris vd., 2012; Mhatre vd., 2014; Demir vd., 2015). Bu organizmanın proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile

dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. İmajinal diskler ergin sineklerde birçok yapıyı oluşturan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Bu diskler tek hücre tabaka yapısındadır. Larval evrede çoğalarak karakteristik morfolojiye sahip olgun diskleri üretirler ve ergin bireylerde farklılaşırlar. Çoğalmaya ve farklılaşmaya giden özelleşmiş epitel hücreleri diploittir ve memeli hücrelerindeki benzer hücre döngüsüne sahiptirler (G_1 , S, G_2 ve M safhalarını içerirler). Gelişimsel siklinler (A-, B- ve E- tip) ve onların siklin bağımlı kinazları sinek ve insan arasında oldukça korunmuştur (Potter vd., 2000). Bu bağlamda pek çok maddenin toksik, genotoksik ve moleküler düzeyde gen ifadesi üzerine etkilerinin belirlenebilmesi açısından *D. melanogaster* mükemmel bir model organizmadır.

Yapılan geniş literatür taramasına göre, çalışmamız *D. melanogaster*'de test edilen çevresel kirleticiler ile ilgili olan riskleri, özellikle de bu kimyasalların *D. melanogaster* *ERR* geninin ifadesi üzerine etkilerini ilk kez ortaya koyması bakımından orijinal özellik taşımaktadır.

1.1. Endokrin Bozucu Kimyasallar

“Endokrin bozucu (EB)” terimi ilk olarak 1962'de Biyolog Rachel Carson'un “Silent Spring” isimli kitabında kimyasal maddelerin kuşlar üzerindeki zararlı etkileriyle ilgili incelemelerini yayınlamasıyla gündeme gelmiştir. Daha sonra 1970'lerde Sullivan ve Barlow, çevredeki kimyasal maddelerin fötüs ve insan sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini bildirmişlerdir (Çetinkaya, 2009).

Endokrin bozucular olarak adlandırılan ksenobiyotikler; alkilfenoller, fitalatlar, polikarbonat-türevi ürünler, pestisitler, poliklorlu bifeniller, dioksinler, organotinler, doğal ve sentetik östrojenler gibi farklı kimyasal gruplardan oluşmaktadır (Güngördü, 2007). Günümüzde EB'ler için pek çok farklı tanımlama yapılsa da, en basit anlamda, organizmaya dışarıdan alınan, doğal ya da insan kaynaklı olan ve bireyler üzerinde bir takım olumsuz etkiler bırakan maddeler EB olarak tanımlanabilir. Daha geniş kapsamlı bir tanım olan, ABD Çevre Koruma Ajansı (US EPA) tanımına göre ise; EB kimyasallar, vücutta gelişimsel sürecin düzenlenmesi ve

homeostazinin korunması için gerekli olan doğal hormonların üretimine, salınımına, taşınımına, bağlanmasına ve atılımına müdahale eden ekzojen ajanlardır (EPA, 2000). Bu bağlamda, çevresel östrojen kavramını da içine alan “Endokrin bozucu” terimi, hormon bozucu ile sinonim olarak kullanılmaktadır (Güngördü, 2007; Hu vd., 2015).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmayla EB’ler, çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinin gözlemlenmesi nedeniyle, ciddi birer tehlike unsuru olarak değerlendirilerek, bilimsel tartışmaların odağı haline gelmiştir (Clotfelter vd., 2004; Göktekin ve Barlas, 2008; Hirsch-Ernst, 2011). ABD Çevre Koruma Ajansı bünyesinde endokrin bozucu tarama ve test etme programlarını geliştirmek için “Endokrin Bozucu Tarama ve Test Danışma Kurulu (EDSTAC)” oluşturulmuştur (EPA, 2000).

EB’ler atık sulara karışarak göl ve deniz gibi doğal sularda, içme suyu kaynaklarında ve besin zincirinde birikim gösterebilirler. Lipofilik karaktere sahip olan bu kimyasallar, vücut dokularında birikim gösterme eğiliminde olmalarının yanı sıra, oldukça kararlı bir yapı sergileyerek, çevrede uzun yıllar bozulmadan kalabilirler. Örneğin, EB olarak değerlendirilen ve çevrede bulunan ağır metaller bozulmaz ya da yok olmazlar. Özellikle dikloro difenil trikloroethan (DDT) ve organoklorlu pestisitler lipofilik karakterlerinden ötürü, memelilerde yağ ve meme dokusunda birikim gösterme eğilimindedirler. Dolayısıyla bu kimyasallar, çok düşük dozlarda bile sağlığı tehdit edebilecek pek çok önemli etkiye sahiptir (Clotfelter vd., 2004).

Günümüzde pek çok kimyasalın endokrin bozucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Pesticide Action Network’e göre diğer kimyasal gruplarla karşılaştırıldığında, endokrin bozucu pestisitlerin EB’lerin en büyük grubunu oluşturduğu rapor edilmiştir (Yu vd., 2013).

1.2. Endokrin Bozucu Kimyasalların Etki Mekanizması

Son yıllarda EB’lerin etkileriyle ilgili pek çok farklı mekanizma ortaya çıkarılmış olsa da, bu mekanizmalardan en önemlileri hormonlar üzerinden oluşturduğu etkilerdir (Knez, 2013).

Endokrin bozucuların hormonlar üzerindeki etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir (Çetinkaya, 2009; Yiğit, 2009).

- Endojen hormonları taklit ederek hormon sentezini ve fonksiyonunu engelleme,
- Depolanan hormonları serbest bırakma, salgılama ve taşınım mekanizmalarını engelleme ve bağlanma,
- Endojen hormonları devre dışı bırakma,
- Hormon reseptörlerini antagonize ya da agonize etme.

Endokrin sistemde meydana gelecek herhangi bir değişikliğin, özellikle meme kanserini de içeren pek çok hastalığa neden olabileceği bir çok çalışma ile gösterilmiştir (Quignot vd., 2012).

Östrojen gibi davranarak doğal östrojenlere benzer etki gösteren ksenobiyotik östrojenler ya da ksenoöstrojenler olarak tanımlanan EB'ler, doğal hormonların sentez ve metabolizmasını etkileyerek ya da hormon reseptör seviyelerinde değişikliğe neden olarak endokrin ve reproduktif etkiler oluşturmaktadır (Shyu vd., 2011; Newman, 2013; Yeşilkaya, 2008).

EB'lerin organizmadaki östrojenik etkisini daha iyi anlayabilmek için, öncelikli olarak östrojen hormonunun etki mekanizmasını incelemek gerekmektedir.

1.3. Östrojen Hormonunun Etki Mekanizması ve Östrojen Reseptörleri

Östrojen, başta ovaryum olmak üzere plasenta ve testis gibi pek çok dokudan salınan ve diğer hormonlarla birlikte dişilerde genital siklusu oluşturan steroid yapıda bir hormondur (Baran ve Kocabağlı, 2000; Giguère, 2002). 1970'li yılların başlarında östrojenin etkisinin sadece üreme organlarıyla sınırlı olduğuna ve tek bir östrojen reseptörünün buna aracılık ettiğine inanılsa da, son yıllarda yapılan pek çok araştırmayla, östrojenin üreme organları dışında, pek çok organda da çeşitli etkilere neden olduğu bildirilmiştir (Esener, 2007; Giguère, 2002). Östrojenin protein ve RNA sentezini uyararak, ovaryum, böbrek, kalp, karaciğer ve beyin gibi organların gelişiminde ve fonksiyon görmesinde önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir (Baran ve Kocabağlı, 2000; Yiğit, 2009; Ortona vd., 2014). Bununla birlikte, östrojen ifadesindeki yanlış düzenlemenin anormal hücre çoğalmasına neden olarak, meme, prostat ve endometrium kanseri gibi çeşitli kanserlerin oluşmasında rol oynadığı rapor edilmiştir (Rao vd., 2011; Giguere, 2002).

Östrojenin biyolojik etkileri ligand ile aktive edilen ve nükleer reseptörlerin bir grubu olan östrojen reseptörleri (ER) aracılığıyla gerçekleştirilir (Rao vd., 2011; Bannister vd., 2013; Micco vd., 2014).

ER'ler, hedef dokularda östrojen reseptör alfa (ER α) ve östrojen reseptör beta (ER β) olmak üzere iki farklı formda bulunur (Chigziola ve Meroni, 2012; Liu vd., 2014; Paterni vd., 2014). Bu reseptörler farklı doku veya organlarda farklı sıklıklarda bulunabilirler. Örneğin, uterus ve meme bezlerinde ER α yoğunluğu fazla iken, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem, kemik, böbrek ve akciğerlerde ER β 'nin baskın olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Altunkaynak vd., 2012).

Lipofilik karaktere sahip olan östrojenler, hücre içine pasif difüzyonla girerek ER'ler tarafından bağlanıp, ER proteininde konformasyonel bir değişikliğe neden olurlar. Normalde inaktif halde bulunan reseptörler, hormonun bağlanmasıyla birlikte değişikliğe uğrayarak DNA'ya bağlanma yeteneği kazanır (Bannister vd., 2013).

1.4. Endokrin Bozucuların Östrojenik Etkisi ve Östrojenle İlişkili Reseptörler

Endokrin bozucu kimyasalların başlıca hedeflerinden biri olan nükleer reseptör (NR)'ler, hormonal sistemin fonksiyon görmesinde büyük öneme sahiptirler (Park ve Kwak, 2010). Transkripsiyon faktörleri olan nükleer reseptörler, organizmada pek çok önemli gelişimsel ve fizyolojik sürecin kontrolünden sorumludur (Liu vd., 2014). NR'leri diğer transkripsiyon faktörlerinden ayıran başlıca özelliği ise, steroid, tiroid hormonu, retinoik asit ve vitamin D gibi küçük lipofilik moleküllerin bağlanmasıyla aktive olmasıdır (Necakov, 2011).

Çeşitli terapötik maddeler tarafından bu reseptörlerde meydana gelecek değişiklikler, kanser, obezite, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar, nörodejenerasyon, inflamasyon ve osteoporoz gibi pek çok patolojik durumun önlenmesinde ve tedavisinde kabul görmektedir (Paterni vd., 2014; Necakov, 2011).

Östrojenle ilişki reseptör (ERR)'ler, nükleer reseptörler süper ailesi başlığı altında yer alan orphan reseptörlerdir. Bilindiği gibi nükleer reseptörler, lipofilik hormonların etkisini transkripsiyonel yanıtlara dönüştüren ve omurgalı gelişiminde önemli rollere sahip olan yapılardır. Orphan reseptörler ise kendileri için tanımlanmış doğal ya da endojen bir ligandın söz konusu olmadığı reseptörlerdir.

ERR reseptörleri birbiri ile yakın ilişkili östrojen reseptörü ile ilişkili reseptör alfa ($ERR\alpha$), östrojen reseptörü ile ilişkili reseptör beta ($ERR\beta$) ve östrojen reseptörü ile ilişkili reseptör gama ($ERR\gamma$) olmak üzere 3 üyeye sahiptir (Um vd., 2012). $ERR\beta$ 'nın ve $ERR\gamma$ 'nın, $ERR\alpha$ ile karşılaştırıldığında ifadelerinin daha sınırlı olduğu ve daha düşük seviyelerde bulunduğu bildirilmiştir (Duellman vd., 2010). $ERR\alpha$, oldukça geniş bir doku dağılımına sahip olmasına rağmen, enerji kaynağı olarak tercihen yağ asitlerini kullanan böbrek, kalp, beyincik, bağırsak ve iskelet kası gibi dokularda yüksek oranda ifade edilir (Schreiber vd., 2004). Yapılan araştırmalar sonucunda $ERR\alpha$ 'nın hedef genler, ko-regülatör proteinler ve DNA bağlanma bölgesi kapsamında $ER\alpha$ ile benzer özelliklere sahip olduğu rapor edilmiştir (Tennessen vd., 2011).

NR'ler; amino terminal bölgesi (NTB), merkezi bir DNA bağlanma bölgesi (DBB) ve ligand bağlanma bölgelerine (LBB) sahiptirler. Bu bölgeler içerisinde farklı üyeler arasında en fazla değişkenlik gösteren bölge NTB'dir. Bu bölgenin en önemli özelliği, güçlü bir transkripsiyon için aktivasyon bölgesi içermesidir. Bu bölgede meydana gelecek herhangi bir post translasyonel modifikasyon ERR'nin transkripsiyonel aktivitesini etkilemektedir. Dolayısıyla bu bölge ERR'nin transkripsiyonel aktivitesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Hirvonen vd., 2011). NR'ler hedef genlerinin promotor bölgesinde bulunan, kendilerine özgü olan DNA dizilerini tanırlar ve bağlanırlar. Bu bağlanmadan sorumlu olan bölge DBB'dir. LBB ise, agonist yada antagonist özellikteki ligandları bağlama yeteneğine sahip olan bölgedir (Giguere, 2008).

Östrojenik kimyasallara örnek olarak DDT, DDE, dioksin, PCB, alkil fenoller ve kanalizasyon atığında ortaya çıkan farmasötikler verilebilir (Newman, 2013). Bunun dışında pestisitlerde, endüstriyel kimyasallarda, deterjanlarda, gıdaların paketlenmesinde kullanılan malzemelerde, plastiklerde ve atık su işletmelerinde kullanılan pek çok sentetik kimyasal östrojen benzeri etkiler göstermektedir (Esener, 2007). Bu bakımdan çevresel östrojenler olarak da adlandırılan bu kimyasallar, insanlar ve sucul canlılarda endokrin sistemin fonksiyonlarını bozarak, üreme sağlığı üzerinde pek çok olumsuz etkiye sahiptir. Buna bağlı olarak bilim çevrelerince bu kimyasallara karşı duyulan ilgi gittikçe artmaktadır (Nie vd., 2014; Shyu vd., 2011).

Organizmanın yaşına ve sağlık durumuna bağlı olarak değişen oranlarda vücuttan atılan östrojenin miktarı önemsiz olarak görünmesine karşın, özellikle

endüstriyel aktiviteler sonucu çevreye salınan çevresel östrojenlerin sularda ve sedimentte birikim göstererek önemli konsantrasyonlara ulaştığı bildirilmiştir (Yıldız, 2009).

Atık su arıtım tesislerinin yanı sıra, hayvancılık ve su ürünleri yetiştiriciliği atıklarının boşaltımı çevresel östrojenlerin en yaygın ve en önemli kaynaklarıdır. Dolayısıyla, çevresel östrojenlerin oluşumunun ve dağılımının yaygın olarak yüzey suları, yeraltı suları, toprak ve sediment aracılığıyla olduğu bildirilmiştir (Nie vd., 2014). Üreme sisteminin fonksiyonlarını bozan bu kimyasalların pek çok canlı türünde, cinsiyet bozuklukları, sperm sayısında azalma, erkek organizmalarda dişilik ve dişi organizmalarda da erkeklik özelliklerini arttırdığı rapor edilmiştir (Yiğit, 2009).

1.5. *Drosophila melanogaster* Nükleer Reseptörleri

Omurgasızların endokrin sistemi ve hormonları, omurgalılar ile doğrudan benzer değildir. Omurgalıların endokrin sistemiyle karşılaştırıldığında, omurgasızların daha yüksek oranda çeşitliliğe sahip olduğu göze çarpmaktadır. Buna ek olarak, hormonlar böceklerin karmaşık yaşam döngüleri boyunca önemli bir role sahiptir. Uçuş için enerjinin sağlanması, metamorfoz ve gömlek değişimi gibi fonksiyonlar hormonların kontrolü altındadır (Park ve Kwak, 2010).

Bilindiği gibi aslında transkripsiyon faktörleri olan NR'ler, kanser, inflamasyon ve diyabeti de içeren pek çok metabolik, homeostatik ve gelişimsel yolun kontrolünden sorumludur. Doğrudan küçük lipofilik ligandların bağlanmasıyla birlikte konformasyonel değişikliğe uğrayan NR'ler, gen transkripsiyonunu aktive etme ya da baskılama suretiyle hedef genin ifadesini düzenlemiş olur (Necakov, 2011).

Nükleer bir reseptör olan ERR, insan sağlığına doğrudan yarar sağlayacak aynı kökenli ligandların belirlenmesinde örnek olarak verilebilecek bir reseptördür. İnsanlarda ERR meme kanserinde ve enerji homeostazisinde oldukça önemli bir role sahiptir. ERR fonksiyonunu değiştirebilen agonist ya da antagonistlerin belirlenmesi, diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi enerji homeostazisindeki dengesizliklerden kaynaklanan hastalıklar ve özellikle meme kanserinin tedavisinde potansiyel yeni araçlar sağlamaktadır (Necakov, 2011). ERR'lerin omurgasızlardan *Drosophila melanogaster* ve *Anopheles gambiae*, ekinodermilerden

Strongylocentrotus purpuratus ve kordalılardan *Branchiostoma floridae*, *Ciona intestinalis* ve *Herdmania curvata*'da bulunduğu belirlenmiştir (Park vd., 2009).

Sayıları organizmadan organizmaya değişiklik gösteren nükleer reseptör genlerinin insandaki sayısı 48 iken, *D. melanogaster*'de omurgalılar ile yüksek derecede homoloji gösteren 18 nükleer reseptör geni bulunmaktadır. Bu 18 reseptör, 6 büyük insan reseptör alt ailesinin herbirine ait temsilci üyelere sahiptir. Sahip olduğu bu özellik, *Drosophila*'yı transkripsiyonel düzenleyicilerin bu farklı aileler içinde moleküler ve genetik çalışmalar yapmak için mükemmel bir model organizma yapmaktadır (Necakov, 2011). Ayrıca *Drosophila*, pek çok potansiyel kimyasal kirleticinin organizmada üreme, ömür uzunluğu, genotoksisite ve hormonal değişiklikler üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla da model organizma olarak kullanılmaktadır.

Drosophila'da ERR geni, ligand bağlayıcı bölgenin (LBB) başlangıcında ekzon varlığına ya da yokluğuna göre iki izoform olarak ifade edilir (*dERR A* ve *dERR B*). *Drosophila*'da ERR geninin ifadesi en erken yumurtlamadan hemen sonra saptanabilir (Tennessee vd., 2011). Yapılan çalışmalar ERR mutantı olan *Drosophila*'ların, düşük ATP seviyesi ve dolaşımdaki yükselmiş şeker seviyesine bağlı olarak, larval fazın ikinci instar evresinde öldüğüne dikkat çekmektedir. Bu çalışmalar *Drosophila*'da ERR geninin karbonhidrat metabolizmasında merkezi bir role sahip olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla ERR genleri glikolizde işlev yapan pek çok genleri içeren birçok metabolik yoldaki anahtar genlerin ifadesini düzenler (Tennessee vd., 2011).

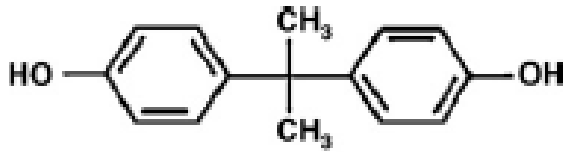
Yapılan pek çok çalışma, çevresel östrojenlere maruz kalma ile kanser oluşumu ve genotoksik etkilerin ortaya çıkması arasında pozitif bir ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir. Dolayısıyla bütün bu özelliklerinden ötürü, çevremizde bulunan bu kimyasalların, toksik ve genotoksik potansiyelleri yönünden test edilmeleri ve moleküler düzeyde etki mekanizmalarını anlayabilmek için ERR geninin ifadesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi zorunlu hale gelmektedir. Bu bakımdan çalışmamızda kullanılan Bisfenol A (BFA), Nonilfenol (NF), Dietilstilbestrol (DES), 17 β -estradiol (E2), Tribütülin (TBT) ve Methidatyon (MD)'un farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmaları ve insan sağlığı açısından olası riskleri yüzünden çeşitli çalışmaların odağı haline gelmiştir. Tez çalışmamız kapsamında ele alınan çevresel

kirleticilerin yapıları, kullanım alanları, çevresel durumları ve etkileri aşağıda kısaca açıklanmaktadır.

1.6. Bisfenol A (BFA)'nın Yapısı

Bisfenol A (BFA), 2,2-bis(4-hidroksifenil) propan yapısında olan, iki fenol ve polikarbonat moleküllerinin birleşmesiyle elde edilen bir bileşiktir (Şekil 1.1). İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir. Bu yolla üretilen BFA genellikle % 99 saflıkta olmaktadır (Prokop vd., 2004). İlk olarak 1891 yılında Rus kimyager Dianin tarafından sentezlenen BFA, oda sıcaklığında katı halde bulunuşu, düşük buhar basıncı, orta derecede suda çözünürlüğü ve düşük uçuculuğu ile dikkat çekmektedir (Asimakopoulos vd., 2012; Huang vd., 2012).

Sudaki çözünürlüğü 25 °C'de 120 mg/L'dir (Ergün, 2013). BFA'nın moleküler yapısı Şekil 1.1. de, kimyasal özellikleri ise Çizelge 1.1. de verilmiştir.



Şekil 1.1. Bisfenol A'nın moleküler yapısı (Asimakopoulos vd., 2012).

Çizelge 1.1. BFA'nın bazı kimyasal özellikleri

Kimyasal Formülü	$(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2$
Molekül Ağırlığı	228,29 g/mol
Yoğunluğu	1,20 g/cm ³
Sudaki Çözünürlüğü	25°C 120 mg/L
Kaynama Sıcaklığı	220 °C

1.6.1. BFA'nın Kullanımı ve Çevresel Durumu

BFA, epoksi, polisülfon, poliakrilat, polieterimid ve doymamış poliester gibi polimer ve reçine üretiminde önemli bir ara ürün olarak endüstride oldukça yüksek miktarlarda kullanılmaktadır. Polikarbonat şişeler (su şişesi ve bebek biberonu),

kaplamalar, diş dolgu malzemeleri, gıda paketleri, yapıştırıcılar, kozmetik ürünleri, elektronik malzemeler, otomobil parçaları, vernik ve boya malzemeleri gibi çok çeşitli materyal ve üründe bulunan BFA, günlük hayatta kolaylıkla karşılaşılabileceğimiz bir maddedir (Asimakopoulos vd., 2012; Gyllenhammar vd., 2012; Huang vd., 2012). Bu bağlamda gün geçtikte giderek artan oranlarda üretilen BFA'nın; 1980'lerde tüm dünyada yıllık üretim kapasitesi 1 milyon ton iken, 2009 yılında 2.2 milyon tonu aşmıştır (Erkekoğlu ve Giray, 2012). 2010 yılında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi tarafından yayınlanan rapora göre, BFA'nın özellikle anne karnında ve çocukluk çağında zararlı etkileri olabileceği rapor edilmiştir. İlerleyen dönemlerde ise pek çok ülke biberonlarda BFA kullanımını yasaklamıştır. 2011 yılı Haziran ayında ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 'Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddeleri ile Temasta Bulunan Plastik Madde ve Malzemeler' Tebliği'nde yaptığı değişiklik yürürlüğe girmiştir. Tebliğ uyarınca, referans numarası "13480" olan "2,2-Bis(4-hidroksifenil) propan", Türk Gıda Kodeksi (TGK)-Bebek Formülleri ve TGK-Devam Formülleri Tebliğleri'nde bebek olarak tanımlanan tüketici grubu için kullanılan, polikarbonat madde ve malzemelerin üretiminde kullanılmaması belirtilmiştir (Durmaz ve Giray, 2013). Ancak ülkemize ithalat ile gelen ucuz plastiklerin yapısında hala BFA bulunabileceği dikkate alınacak olursa, özellikle bebeklerin ve çocukların bu bileşik ile etkileşim içerisinde oldukları söylenebilir (Erkekoğlu ve Giray, 2012).

BFA oral emilimi takiben, karaciğerde hızlı bir şekilde çoğunlukla CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile ana metaboliti olan bisfenol A-glukuronide metabolize edilir ve hızlı bir şekilde idrarla atılır (Zemheri, 2011). Vücutta idrardan başka, kan, yağ dokusu, anne sütü, semen, tükürük, foliküler sıvı, plasenta ve göbek kordonu kanında bulunduğu bildirilmiştir (Kovacic, 2010).

Bir maddenin tolere edilebilir günlük alım miktarı, vücut ağırlığı dikkate alınarak ifade edilen ve tüm yaşamı boyunca herhangi bir risk oluşturmadan her gün tüketilebilir olan miktardır (Durmaz ve Giray, 2013). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre yetişkinler için BFA günlük alım miktarı ortalama olarak vücut ağırlığının 0.4- 1.4 µg/kg, en kötü senaryo ile 4.2 µg/kg olduğu tahmin edilmektedir (FAO/WHO,2011) (Gyllenhammar vd., 2012).

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan pek çok çalışmada BFA'nın çok düşük dozlarda bile sağlık üzerinde birtakım olumsuz etkilere neden olduğuna dikkat

çekilmektedir. Bu bağlamda, BFA'ya maruz kalan hamile kadınlar ve fetüslerindeki BFA düzeyleri değerlendirildiğinde, anasal ve fetal BFA konsantrasyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir (Lee vd., 2008). Yapılan başka bir çalışmayla yavruda BFA konsantrasyonunun anneye göre daha az olduğu ancak, BFA'nın birikim gösterme eğiliminden olmasından ötürü, fetüsün risk altında olduğu gösterilmiştir (Gülnaz, 2006). Ayrıca yapılan pek çok çalışmayla, doğum öncesi evrede ve yenidoğan gibi gelişimin erken dönemlerinde BFA'ya maruz kalan kemirgenlerin, yetişkin evrede maruz kalanlara oranla daha ciddi sorunlarla karşı karşıya kaldıkları rapor edilmiştir (Izumi, 2008). Bunun dışında ABD'deki yetişkin popülasyonda obezite ile idrardaki yüksek BFA seviyesi arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Carwile vd., 2011).

1.6.2. BFA'nın Endokrin Bozucu Etkisi

BFA 1930'lu yıllarda östrojenik etkiye sahip olduğunun saptanmasıyla birlikte pek çok araştırmacının ilgi odağı haline gelmiştir. Yapılan birçok çalışma ile BFA'nın östrojen reseptörlerine (ER) bağlanarak, östrojene yanıt olarak oluşan gen ifadesini indüklediği ve östrojenik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Erkekoğlu ve Giray, 2012; Durmaz ve Giray, 2013).

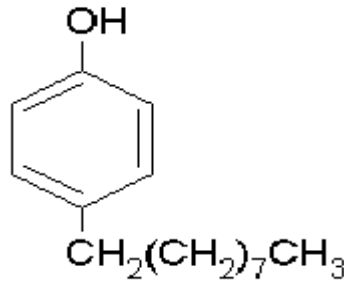
BFA'nın ER α ve ER β reseptör bölgelere bağlanabilme özelliği DES'e göre yaklaşık 20.000 kat, 17 β -estradiol'e göre ise yaklaşık 10.000 kat daha zayıftır (Gülnaz, 2006; Durmaz ve Giray, 2013). BFA'nın östrojenik aktivitesi dokunun içerdiği ER tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. *In vitro* olarak yapılan çalışmalarda BFA'nın ER β 'ya bağlanma ilgisinin ER α 'ya göre 10 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Yiğit, 2009).

BFA'nın insanlar üzerindeki etkilerini konu alan çalışmalar gözden geçirilecek olursa, ilk veriler 2002 yılında Takeuchi ve Tsutsumi tarafından yayınlanmıştır (Takeuchi ve Tsutsumi, 2002). Buna göre ilginç bir şekilde kadın ve erkeklerde BFA ile toplam ve serbest testosteron seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca mesleki olarak BFA'ya maruz kalan erkeklerin idrarlarında kontrol grubuna göre daha yüksek konsantrasyonlarda BFA seviyesine rastlanmıştır. Ayrıca BFA'ya bağlı olarak FSH seviyesinde azalma gözlenmektedir (Knez, 2013). BFA'nın antitiroid hormon aktivitesi ve bağışıklık sistemi ile sinir sistemi üzerindeki bir takım olumsuz etkilerinin rapor edildiği sayısız çalışmadan sonra, standart bir test

sistemi için BFA'nın endokrin bozucu etkilerinin izlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Izumi vd., 2008).

1.7. Nonilfenol (NF)'ün Yapısı

Çevrede bulunan zararlı kimyasalların önemli bir grubunu alkilfenol etoksilat bileşikleri (AFE) oluşturmaktadır. Bir AFE molekülü, alkilfenol ve etoksilat olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Bu yapı, alkilfenol etoksilatları suda çözünür hale getirerek kirli yüzeylerden kirin uzaklaştırılmasına yardım etmektedir (Atlı, 2010). AFE bileşiklerinin en önemli üyeleri, nonilfenol etoksilat ve oktilfenol etoksilatlarıdır. Bu bileşikler etilen oksit yan zincirlerini kaybederek, alkilfenollere dönüşürler. (4-*n*-oktilfenol ve 4-*n*-nonilfenol) (Knez, 2013). Alkilfenoller, çevrede çeşitli endüstriyel aktiviteler sonucu ortaya çıkan, plastiklerde, pestisitlerde destekleyici olarak, temizlik maddelerinde ve deterjanlarda aktif madde olarak kullanılan kimyasallardır. (Newman, 2013). En önemli alkilfenollerden biri olan Nonilfenol (NF), AFE bileşiklerinin yaklaşık %82'sini oluşturur ve biyolojik olarak bozunmaya en dayanıklı olan, oldukça toksik, organizmalarda biyolojik olarak birikim gösteren bir kimyasaldır (Li vd., 2010; Richardson vd., 1999). NF'nin moleküler yapısı Şekil 1.2'de, bazı kimyasal özellikleri ise Çizelge 1.2'de verilmiştir.



Şekil 1.2. Nonilfenol'ün moleküler yapısı (Asimakopoulos vd., 2012).

Çizelge 1.2. Nonilfenol'ün bazı kimyasal özellikleri

Kimyasal Formülü	C ₁₅ H ₂₄ O
Molekül Ağırlığı	220,25 g/mol
Yoğunluğu	0,94 g/cm ³
Sudaki Çözünürlüğü	6 mg/L (pH 7)
Kaynama Sıcaklığı	180-181 °C

1.7.1. NF'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu

NF, yüksek performansı ve maliyetinin düşük olması nedeniyle endüstride en çok tercih edilen kimyasallardan biridir (Naylor, 1995). Kozmetik ürünlerinde, plastik boyalarda, yiyecek ve içecek ambalajlarında, ev ve sanayi deterjanlarında, kağıt, deri, tekstil ve petrol endüstrisinde, pestisitlerde, sterilizasyon malzemelerinde, halı ve kilim fabrikalarında, lateks üretiminde, spermisit olarak kondomlarda, bebek biberonu ve oyuncaklar gibi çok geniş bir yelpazede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Atlı, 2010; Capaldo vd., 2012; Gyllenhammar vd., 2012; Naylor, 1995; Sayed vd., 2012; Espinosa vd., 2009; Asimakopulos vd., 2012). Danimarka Çevre Ajansı'na göre tolere edilebilir günlük NF alımı vücut ağırlığının 5 µg/kg olarak kabul edilmektedir (Espinosa vd., 2009).

Çevrede oldukça kararlı ve kalıcı olan NF, 1940 yılında keşfedilmesinden bu yana, endüstrinin gelişmesiyle birlikte, yüksek miktarlarda sentezlenmekte ve özellikle su içerisine boşaltılmaktadır. Bu nedenle sıklıkla atık sularda ve gıdalarda bulunur. (Knez, 2013; Balakrishnan vd., 2011). Bu bağlamda NF ile yapılan çalışmalar özellikle sucul çevre üzerine odaklanmıştır. Yapılan bir çalışma NF'nin başkalaşım sırasında, *Rana nigromaculata* iribaşlarının kuyruklarında malformasyonlara neden olduğuna dikkat çekmektedir (Capaldo vd., 2012).

NF, özellikle üreme sisteminde büyük hasarlara neden olarak, sperm sayısında azalmaya neden olmaktadır. Yapılan sayısız çalışmayla birlikte NF'nin insanda reaktif oksijen türlerinin üretimini artırarak, oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Aly vd., 2012). Bir çalışmada, gıda maddelerindeki NF miktarlarını belirlemek amacıyla, Almanya'da yeni doğan ve yürümeye başlayan çocukların tükettikleri gıda maddelerindeki NF miktarları ölçülmüştür. Çalışmada, gıda maddelerinde bol miktarda NF bulunduğu ve bu durumun özellikle yeni doğan bebekler için yüksek risk oluşturduğu bildirilmiştir (Raecker vd., 2011).

Alkilfenollerin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine dair endişelerin giderek artması üzerine, 2002 yılında Avrupa Komisyonu Ortak Araştırma Merkezi tüm deterjanlardaki alkilfenollerini yasaklamıştır. Ancak günümüzde hala pestisitlerde ve plastiklerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Espinosa vd., 2009).

Alkilfenollerin kemirgenler ve sucul canlılar üzerindeki etkisine dair çok sayıda çalışma olmasına rağmen, insanlar üzerine yapılan çalışmalar oldukça

yetersizdir. Yapılan çalışmalar özellikle anne sütü aracılığıyla alkilfenollerin önemli bir düzeyde bebeğe geçtiğini göstermiştir. Ancak literatür taraması yapılırken, sağlık üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla, alkilfenol maruziyetiyle bağlantılı insan epidemiyolojik çalışmaları bulunamamıştır (Knez, 2013).

1.7.2. NF'nin Endokrin Bozucu Etkisi

NF'nin çeşitli balık türleri, kuşlar ve memeliler üzerinde östrojenik, toksik ve karsinojenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Sayed vd., 2012). Steroid olmayan fenolik bir bileşik olan 4-Nonilfenol (4-NF)'ün, 17 β -östradiol ve DES ile olan yapısal benzerliği ile dikkat çekmektedir (Balakrishnan vd., 2011). Bu bağlamda ksenoöstrojen olarak tanımlanan NF, dişi cinsiyet hormonlarını taklit etmesi nedeniyle pek çok araştırmanın odağı haline gelmiştir. Östrojen reseptör yolunu etkileyebilen NF, sahip olduğu lipolitik etkiye bağlı olarak insanlar ve hayvanlar üzerinde oldukça toksik etkilere sahiptir. Birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma NF'nin hayvanlarda ve insanlarda üreme fonksiyonlarını değiştirerek, endokrin sistemi etkilediğini göstermektedir (Espinosa, 2009). Bu açıdan, östrojen reseptörüne zayıf bağlanma potansiyeline sahip olan NF'nin, ER α 'yı aktive ederek, östrojen bağımlı gen ekspresyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Vivacqua vd., 2003; Knez, 2013; Raecker vd., 2011; Villeneuve vd., 2002).

Yapılan pek çok çalışma ile özellikle 4-NF'nin insanda teratojenik ve kanserojenik etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. 4-NF'nin östrojen reseptörleriyle doğrudan etkileşimi sonucu, üreme fonksiyonlarının olumsuz yönde etkilendiği ve membrana bağlı östrojen reseptörlerini taklit ederek, 17 β -östradiol'e benzer aktivite gösterdiği bilinmektedir. 4-NF'nin, ER α ve ER β reseptörleri, ERR α , β ve γ (östrojenle ilişkili reseptörler), büyüme hormonu, p53 ve 11- β -Hidroksisteroid dehidrogenazın ekspresyonlarını düzenlediği gösterilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, 4-NF'nin potansiyel bir endokrin bozucu olduğu ve özellikle fetal dönemdeki maruz kalmaya bağlı olarak insanlarda gelişimsel anormalliklere neden olabileceği öne sürülmüştür. (Balakrishnan vd., 2011). Bu açıdan 2003 yılından bu yana Avrupa Birliği tarafından NF'nin kullanımında kısıtlamalar getirilmiştir (Sayed vd., 2012).

Alkilfenollerin östrojenik etkisi yaygın olarak laboratuvar kemirgenleri üzerinde çalışılmaktadır (Knez, 2013). Yapılan araştırmalar sonucu NF'nin östrojen reseptörlerine bağlanarak, MCF-7 hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve sıçan

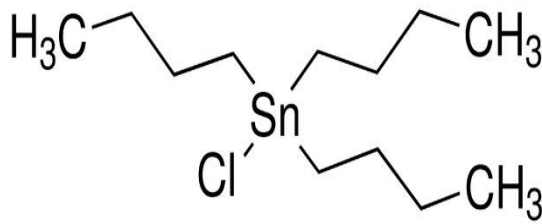
uterusunda mitotik aktiviteyi indüklediği bildirilmiştir. Özellikle erkek üreme sistemini etkileyen NF, epididimal ağırlıkta ve sperm sayısında azalmaya neden olmaktadır (Ferguson vd., 2000; Knez, 2013).

Balıklar üzerinde yapılan çalışmalarda, NF'nin balıklarda cinsiyet hormonlarının konsantrasyonlarını değiştirdiği ve spermatogenezi inhibe ederek, gonadosomatik değerleri değiştirip, erkeklerde ovotestis gelişimini indüklediği saptanmıştır. Böylece juvenil çağda dişileşmeye neden olduğu rapor edilmiştir (Lahnsteiner vd., 2005; Michelangeli vd., 2008).

1.8. Tribütiltin (TBT)'in Yapısı

Tribütiltin (TBT), $(C_4H_9)_3Sn^+-X$ kısmı içeren bileşikler grubudur. Burada X, anyon veya kendisine bağlı bir grubu göstermektedir. X'in yapısı, TBT'nin su ve polar olmayan çözücülerdeki çözünürlüğü ve buhar basıncı gibi fizikokimyasal özelliklerini etkilemektedir. Klorlama (TBTCI) bu bileşiklere yüksek oranda lipofilik karakter kazandırarak, çevrede oldukça kararlı hale getirir. Böylece çevrede kolaylıkla birikim göstererek besin zinciri aracılığıyla insana kadar ulaşan pek çok organizmayı etkileyebilmektedir (Sharan, 2013). Bu gerçekler göz önüne alındığında TBTCI'nin özellikle sucul yaşam için en güçlü toksik kimyasallardan biri olduğu söylenebilir (Sharan vd., 2013).

TBTCI'nin moleküler yapısı Şekil 1.3'de, bazı kimyasal özellikleri ise Çizelge 1.3'de verilmektedir.



Şekil 1.3. Tribütiltin klorid (TBTCI)'in moleküler yapısı (Ferreira vd., 2012).

Çizelge 1.3. TBTCİ'nin bazı kimyasal özellikleri

Kimyasal Formülü	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_3\text{SnCl}$
Molekül Ağırlığı	325,51g/mol
Yoğunluğu	1,2 g/mL at 25 °C(lit.)
Kaynama Sıcaklığı	171-173 °C/25 mmHg (lit.)

1.8.1. TBT'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu

1960'lı yıllarda özellikle kimya endüstrisinin gelişmesiyle birlikte, Tribütülin (TBT) ve Trifenilkalay (TPT) gibi organik kalay bileşikler, etkili biyosidal özellikleri nedeniyle, dezenfektan ve biyosit olarak yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Okay, 2004; Newman, 2013; Yu vd., 2013; Liu vd., 2012, Zheng vd., 2005). Oldukça etkili bir biyosit olan TBT, midye gibi deniz canlılarının gemi yüzeyinde çoğalmalarını önlemek amacıyla, geminin su çizgisinin altına sürülen boyalarda yosunlaşmayı önleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Yu, vd., 2013; Vardar ve Harjono, 2002). Yüksek derecede etkili olması ve nispeten düşük maliyeti nedeniyle, 1970'lerden beri yüzey koruyucu ajan olarak TBT'nin üretimi ve kullanımı önemli ölçüde artmıştır (Newman, 2013). Bunun dışında, ahşap ürünlerin korunmasında, soğutma suyu sistemlerinde, odun hamuru ve kağıt fabrikası sistemlerinde, bira fabrikasında, tekstil ve endüstriyel su sistemlerinde yosunlaşmayı önleyici ajan olarak yoğun olarak kullanılmaktadır (Park ve Kwak, 2010).

Alternatiflerine göre tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden biri oldukça etkili ve dayanıklı olmasıdır (60 ay; alternatifleri 30- 36 ay). 1980'li yıllarda TBT'nin yarılanma ömrünün oldukça uzun olduğunun (>6 ay) belirlenmesiyle birlikte, sedimentte ve organizmada kolaylıkla birikim yapabileceğinin farkına varılmıştır (Okay, 2004). Özellikle anaerobik şartlar altında, deniz sedimentlerinde TBT ve bozunma ürünlerinin tahmini olarak onlarca yıl bozulmadan kalabileceği tahmin edilmektedir (Zhang vd., 2013).

1970'lerin sonlarından başlayarak, birçok bilim adamı TBT bileşiklerinin çok düşük konsantrasyonlarda bile sucul organizmalar üzerinde toksik etkilere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu bağlamda, toksik, kalıcı, biyobirikimli ve endokrin bozucu özelliğe sahip olması nedeniyle, Avrupa Birliğinin öncelikli kirleticiler listesine dahil edilmiştir (Morales vd., 2013; Ferreira vd., 2013). Sucul sistemler için oldukça toksik olan TBT, genotoksik, nörotoksik, hepatotoksik, teratojenik,

bağışıklık baskılayıcı ve endokrin bozucu etkileri ile balık, deniz yıldızı ve deniz solucanı gibi sucul organizmalar için önemli bir tehlike oluşturmaktadır (Park vd., 2013). TBT'ye maruz kalma sonucu ördek, fok ve balıklarda biyolojik birikimin olduğu ve balıklarda bağışıklığın zayıfladığı pek çok çalışmayla rapor edilmiştir. Başka bir çalışmada yosunlaşmayı önleyici boyalardan süzülen TBT'nin bir istiridye türü olan *Carassostrea gigas*'ta kabuk deformasyonu, büyüme azalması ve üreme başarısızlığı gibi etkilere neden olduğu saptanmıştır (Newman, 2013).

TBT'nin canlı organizmalar üzerindeki olumsuz etkilerinin gözlenmesinden sonra, Ekim 2001'de düzenlenen Uluslararası Denizcilik Örgütü (IMO) toplantısında, zehirli organotinler içeren gemi boyalarının, Ocak 2003'ten itibaren kullanımdan kaldırılmasına ve 2008'de organotinli boyaların tüm gemilerden uzaklaştırılmasına veya güvenli biçimde muhafaza edilmesine karar verilmiştir.(Gemilerdeki Zararlı Çürüme-önleyici Sistemlerin Kontrolüne ilişkin Uluslararası Konvansiyon, 2001) (Vardar ve Harjono, 2002). TBT kullanımı, bu sözleşmeye dahil olan pek çok ülkede yasak olmasına karşın, diğer ülkelerde üretimine devam edildiği ve biyosit olarak kullanıldığı düşünülmektedir (Ferreira vd., 2013).

1.8.2. TBT'nin Endokrin Bozucu Etkisi

Memeliler, özellikle de insanlar, deniz ürünleri, gıda maddeleri ve içme suyu gibi çok çeşitli yollarla kaçınılmaz bir şekilde TBT'ye maruz kalmaktadır (Chen vd., 2008; Ferreira vd., 2013). Özellikle gelişimin erken dönemlerinde bu maruziyet sonucu üreme organları ve cinsel olgunlaşma üzerinde bir takım olumsuz etkiler gözlenmektedir. Kapsamlı bir şekilde literatür taraması yapıldığında, TBT'nin çoğunlukla yumuşakçalar ve balıklar üzerindeki endokrin bozucu etkilerine rastlanmakla birlikte memeliler üzerine sadece birkaç makale göze çarpmaktadır (Chen vd., 2008; Zhang vd., 2013). Yapılan bir çalışmada TBT maruziyeti sonucu, zebra balıklarında cinsiyet oranının erkekler yönünde değiştiği rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, dişi yumuşakçalarda erkek üreme organlarının geliştiği bildirilmiştir (Chen vd., 2008; Zhang vd., 2013; Yu vd., 2013). Dişilerdeki böylesine anormal bir gelişim, erkek özelliklerin dişide gelişmesi yani imposeks olarak tanımlanmaktadır. Pek çok türde imposekse bağlı olarak dişilerin öldüğü gözlenmiştir. Böylesi bir letal sonuç doğal popülasyonlarda cinsel açıdan olgun dişi sayısını önemli ölçüde azaltabilir ve lokal olarak neslin tükenmesi gibi oldukça ciddi

sonuçlara yol açabilir. Neslin tükenmesi çevresel TBT konsantrasyonunun yüksek olduğu marina, liman, iskele ve ana gemi seferi kanallarına yakın alanlarda yaygın olarak gözlenmektedir (Newman, 2013). Ema ve Harazono (1995, 1996) yaptıkları çalışmalarda, sıçanlarda gebeliğin çok erken dönemlerinde TBT maruziyeti sonucu, doza bağlı olarak doğurganlıkta önemli ölçüde azalma, implantasyonun engellenmesi ve implantasyon sonrasında embriyo ölümü ve teratojenik etkiler gözlenmiştir (Chen vd., 2008).

Endokrin bozucu olarak tanımlanan TBT, son zamanlarda metabolik bozucu olarak da ifade edilmektedir. Aynı zamanda insan kemik iliği hücrelerinde lipid birikimi ve yağ hücresi farklılaşmasını indüklediği ve yumurtalık gelişimini engellediğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca bir çok çalışmayla yetişkin balıklarda testis gelişimini engellediği bildirilmiştir (Zhang vd., 2013).

Bilindiği gibi aromatazlar, östrojen biyosentezinin son basamağında görev alan bir enzim kompleksidir. Meme, yumurtalık, testis, plasenta, beyin ve adipoz doku gibi pek çok dokuda androjenlerin östrojenlere dönüşümünü sağlayarak total östrojen düzeyini arttırmaları (Karahana ve Kelicen, 2011). Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada kronik olarak TBTC'ye maruz kalan sıçanların beyinlerinde bu bileşiğin birikim yaptığı bildirilmiştir (Omura vd., 2004). TBT'nin beyinde aromatazların ifadesini inhibe ederek, maskülinizasyon etkisi yarattığı da rapor edilmiştir (Zhang vd., 2013). Fare ve sıçanlarda TBT'nin yüksek oranda birikim gösterdiği başlıca dokular arasında karaciğer, böbrek, dalak, yağ ve testisler gelmektedir (Ferreira vd., 2013).

Kaya balıklarında düşük TBT konsantrasyonlarında beyin ER α and ER β ifadesinde artış olduğu bildirilmiştir. Bilindiği gibi beyin en önemli endokrin organlardan biridir ve balıkların üremesinde önemli bir role sahiptir. Yapılan bir çalışmada TBT'nin kompleks endokrin bozucu etki göstererek, kayabalıklarında Cyp19b ve ER ifadesini etkilediği bildirilmiştir (Zhang vd., 2013). Ayrıca son yıllarda yapılan pek çok doz bağımlı *in vivo* ve *in vitro* çalışma ile birlikte, TBT'nin yağ hücrelerinde ER α and ER β 'yi aktive ettiği rapor edilmiştir (Sharan vd., 2013).

1.9. Methidatyon (MD)'un Yapısı

Methidatyon (MD) (S-[(2,3- dihydro-5- methoxy-2-oxo 1,2,3-thiadiazol-3(2H)- yl] 0,0- dimethyl phosphorodithioate), oldukça geniş spektrumlu organofosfatlı (OF) bir insektisittir (Takayasu vd., 2012). Oldukça toksik olan MD, 1991 yılında ABD EPA tarafından, sınıf 1 toksik bir kimyasal olarak, son derece

toksik bir bileşik olarak listeye dahil edilmiştir (Stavropoulos vd., 2000). MD'nin dahil olduğu OF bileşikleri, fosfor içeren asitlerin ester, tiol ester veya anhidrit türevleridir. Bu bileşikler asıl etkilerini sinir sistemi üzerinde gösteren kimyasallardır (Demirdöğen, 2010).

1.9.1. MD'nin Kullanımı ve Çevresel Durumu

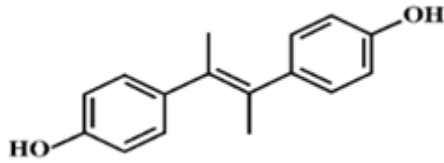
1966'dan beri ticari olarak seralarda ya da açık alanlarda yetiştirilen meyve ağaçları, üzüm asmaları ve sebzelerin yetiştirilmesinde, çeşitli böcek ve akarlara karşı mücadelede yaygın bir şekilde kullanılan ancak günümüzde yasaklanan MD, asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini inhibe ederek, hedef canlının sinir sistemini zayıflatıcı etki göstermektedir (Stavropoulos vd., 2000; Güngördü, 2013; Güney vd., 2007; Takayasu vd., 2012). MD'nin de dahil olduğu organofosfatlar asetilkolinesteraz enzimini, aktif bölgesindeki serin aminoasitinin hidroksil grubunu fosforlayarak inaktif hale getirirler. Asetilkolinesteraz enziminin baskılanmasıyla, sinir sisteminde asetilkolin birikimi başlayarak, muskarinik ve nikotinik reseptörler aşırı oranda uyarılmış olur. "Kolinerjik sendrom" olarak bilinen bu duruma bağlı olarak, merkezi sinir sisteminde asetilkolin miktarının artması sonucu, birtakım duyuşsal ve davranışsal bozukluklar, koordinasyon bozuklukları, motor fonksiyonların baskılanması ve solunum yetmezliği gibi ciddi sağlık sorunları ortaya çıkar. Solunum bozukluğuna eşlik eden artmış akciğer salgıları, organofosfat zehirlenmelerinde görülen ölümlerin en sık karşılaşılan nedenidir. (Demirdöğen, 2010). Organofosfatlar, hem insanlarda hem de hayvanlarda merkezi sinir sistem, kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem, metabolik ve endokrin sistem ve kolinesterazları inhibe ederek etkilemektedir (Gökarp vd., 2003).

Geniş spekturumlu etkisine bağlı olarak, MD'nin tarımda, evlerde, bahçelerde ve veterinerlikte yaygın bir kullanım alanı bulunmaktadır. MD'nin de dahil olduğu OF bileşikleri son derece toksik olmalarına rağmen, çevrede organoklorlu pestisitler (OK) kadar kalıcı değildir. Güneş ışığı, hava veya toprakla temas sonucu hızlı bir şekilde hidroliz olarak parçalanırlar. Bu özellikleri sayesinde DDT, aldrin ve dieldrin gibi çevrede son derece kalıcı olan OK bileşiklerinin yerine alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır. Ancak her ne kadar OF bileşikleri, OK bileşiklerine göre daha hızlı parçalansa da, akut toksisiteleri daha yüksektir. Dolayısıyla pestisit zehirlenmelerinde OF bileşikleri ilk sırada gelmektedir (Demirdöğen, 2010). Özellikle, OF bileşiklerin sıkça kullanılması bu bileşiklerin çevrede yaygın bir

şekilde bulunmasına ve biyolojik sistemler üzerinde zararlı etkilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Yapılan pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışma, organofosfatlı insektisitlerin lipid peroksidasyonunu arttırdığını ve eritrositlerdeki antioksidan enzimlerinin aktivitelerini değiştirdiğini göstermektedir (Altuntas vd., 2002). Bunun dışında OF bileşiklerin, karaciğer, böbrek, kalp, pankreas ve bağışıklık sistemi gibi pek çok dokuda biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (Yavuz vd., 2005). OF bileşiklerin hedefi olan organlardan biri de, yumurta oluşumu ve hormonların senteziyle normal olarak üreme fonksiyonlarında önemli bir rol oynayan yumurtalıklardır (Güney vd., 2007).

1.10. Dietilstilbestrol (DES)'in Yapısı

Dietilstilbestrol (DES) 4-[4-(4-hydroxyphenyl)hex-3-en-3-yl]phenol, farmakolojik etkileriyle doğal estronlara benzeyen ve ER'lere yüksek afiniteye sahip olan yaygın bir non-steroid sentetik estrojendir (Takayanagi vd., 2006) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Dietilstilbestrol'ün moleküler yapısı (Takayanagi vd., 2006).

1.10.1. DES'in Kullanımı ve Endokrin Bozucu Etkisi

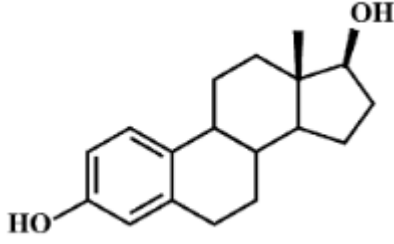
İlk defa 1938 yılında Leon Goldberg tarafından sentezlenen sentetik östrojenik bir bileşik olan DES, ilk olarak gebeliği korumak amacıyla hamile kadınlarda 1947-1971 yılları arasında kullanılmıştır (Bosquiazzo vd., 2013). Ancak daha sonraları yapılan çalışmalarla, DES'in klinik olarak düşüğü engellemesine rağmen, DES'e maruz kalan kadınlarda meme kanseri gelişme riskinin yaklaşık 2 kat artış gösterdiği ve DES kullanmış olan annelerin kız çocuklarında serviks ve vajina adenokarsinomuna daha sık rastlandığı saptanmıştır (Walker ve Kurth, 1993; Bosquiazzo vd., 2013; Bhan vd., 2014). Bu bağlamda genotoksik ve karsinojenik etkiye sahip olduğu bilinen DES'in çok az miktarlardaki kalıntısı dahi karsinojenik etkinin oluşum sürecini başlatabilmektedir (Oruç vd., 2007).

Fetal dönemde DES'e maruz kalan erkek çocuklarda ise azospermi, kısırlık ve testis kanseri riskinin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Göze vd., 2000; Yeşilkaya, 2008). Ayrıca insanda DES maruziyeti ile üreme yolları anomalileri arasında bir ilişki olduğu da rapor edilmiştir (Hammes vd., 2003). Bunun üzerine DES piyasadan kaldırılmıştır (Yeşilkaya, 2008).

Evcil hayvanlardan elde edilen et miktarında artışı sağlamak ve yemden yararlanma oranını arttırmak amacıyla, ilk kez 1947 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) DES ile başlayan anabolizan maddelerin kullanımı, sağladığı büyük ekonomik faydaları nedeniyle yaygınlık kazanmıştır. Ancak daha sonraları yapılan araştırmalar sonucunda DES'in karsinojen etkisi anlaşılmış ve kasaplık hayvanlarda anabolizan maddelerin kullanımı sınırlandırılmıştır. Avrupa Birliği (AB)'nde de, 1989 yılından beri büyüme hormonu uygulanan hayvanların etlerinin tüketime sunulması yasaklamıştır. Ülkemizde de Resmi gazetede yayınlanarak yürürlüğe giren 2003/18 sayılı gıda değeri olan hayvanlara uygulanması yasaklanan ve belli şartlara bağlanan hormon ve benzeri maddeler hakkındaki tebliğe göre; stilbenler, stilben türevleri, tuzları ve esterleri, antitiroidal etkili maddeler, anabolizan amaçla kullanıma uygun steroidler, rezorsilikasit laktonlar, beta agonist etkili hormon ya da hormon benzeri etkiye sahip maddelerin gıda değeri olan hayvanlara anabolik amaçlarla uygulanması yasaklanmıştır Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı tarafından ruhsatlı olmak kaydıyla belirtilen maddeleri içeren ilaçlar ancak veteriner hekim reçetesine tabi olarak satılabilmektedir. Ancak mezbahalarda laboratuvar donanımının yetersiz oluşu dikkate alınacak olursa anabolizan madde içeren etlerin tespitinde sıkıntılar yaşanma olasılığı oldukça yüksektir (Oruç vd., 2007).

1.11. 17 β -östradiol (E2)'in Yapısı ve Etkisi

Yapısında aromatik A halkasının, 3. karbon (C3) atomu'nda bulunan fenolik hidroksil grubu ile beraber 17. karbon (C17) atomunda hidroksil grubu yer alan E2, gelişim ve üreme fonksiyonlarında anahtar role sahiptir (Karagül, 2006) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. 17β-östradiol'ün moleküler yapısı (Takayanagi vd., 2006).

Dolaşımda bulunan doğal östrojen hormonlarının başlıcaları 17β-östradiol (E2), östron (E1) ve östriol (E3)'dür. Bunlar içerisinde en etkili olan E2'dir. Ayrıca E2 ve E1 karaciğerde birbirlerine dönüşebilmektedir. Hem erkek hem de kadında bulunan östrojen hormonunun, üreme çağında olan kadınlardaki seviyesi erkeklere nazaran oldukça yüksektir. Eşeyssel olgunluğa erişmiş bir kadının kanında en fazla oranda bulunan ve en etkili olan östrojen hormonu yumurtalık kaynaklı olan E2'dir (Bayraktar, 1996).

Östrojen memeli dokuların çoğunda; hücrelerin büyümesi, embriyolojik gelişimi ve yaşamın devamlılığı açısından önemli rollere sahiptir. (Altunkaynak vd., 2012). Kadın üreme sisteminin gelişimi ve korunması ve erkeklerde sperm üretimi için gerekli olan steroid bir hormon olan östradiol, aynı zamanda kardiyovasküler sistem, merkezi sinir sistemi ve kemik gelişimi için de büyük öneme sahiptir (Giguere, 2008). Hedef hücreye ulaşan östrojenler, bağlı olduğu özel plazma proteininden ayrılarak, serbest hale geçerler. Düşük molekül ağırlıklı ve yağda çözünebilir özelliğe sahip olan östrojen, difüzyon aracılığıyla hücre zarından rahatlıkla geçebilir. Hücrenin sitoplazmasına ulaştığında, diğer steroid hormonlardan farklı olarak özgün bir reseptör proteine bağlanmaksızın nukleusa gelerek, nukleusta kromatine tutunmuş olan reseptöre bağlanır. Aktif hale geçen hormon- reseptör bileşimi, gen etkileşimini ve kromatindeki DNA'dan mRNA'nın yapımını başlatır. mRNA nukleustan ayrılarak, sitoplazmaya geçer ve granüllü endoplazmik retikulumun dış yüzeyindeki ribozomlarda hormona özgü özel yeni proteinlerin oluşumunu başlatır (Esener, 2007; Seyran ve Erişir, 2008).

Bilindiği gibi birçok sentetik endüstriyel kimyasal androjen ve östrojen gibi hormonların etkilerine benzer etkiler göstermektedirler. Bu bağlamda 1998 yılında İngiltere'de yapılan bir çalışmada E2'nin lağım sularının karıştığı nehirlerde bol

miktarda bulunduğu rapor edilmiştir. Benzer bulgular Hollanda, Kanada, Almanya, İsveç ve Türkiye’den de bildirilmiştir (Çek ve Sarıhan, 2010).

Farklı organizmalarda yapılan çalışmalarda, E2’nin yüksek dozlarda uygulanmasına bağılı olarak ölüm oranını yükselttiğı ve büyüme oranını düşürdüğü bildirilmiştir. Her ne kadar E2 uygulamasının genellikle büyümeyi artırıcı bir etkisinin olduğu rapor edilse de, yüksek konsantrasyonlu uygulamalarda balıkların ağırlık artışında doza bağılı olarak azalmalar meydana geldiğı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, 100 µg/L E2 uygulaması sonucu balıklarda yaşama oranı %90 olarak belirlenmişken, 200 µg/L E2 uygulamasında yaşama oranının %70’ düştüğü gözlenmiştir. Buna bağılı olarak E2’nin belli bir dozdan sonra toksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Turan vd., 2005).

1.12. Genetik Toksikoloji

Kelime anlamı ile toksikoloji, “zehir bilimi” demektir (Vural, 2005). Daha geniş bir ifadeyle toksikoloji, organizmaların üzerinde birtakım olumsuz ya da istenmeyen etkiler bırakan etmenlerin ortaya çıkışını, onların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini, canlı organizmada uğradığı değişimi ve etki mekanizmalarını olası risk faktörleri ile birlikte deneysel olarak inceleyen bir bilim dalıdır (Doğan, 2008).

Toksikolojik çalışmalar, toksik etkinin hücresel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmasının yanı sıra bağışıklık üzerine olan etkilerini de inceler. Bu bağlamda, multidisipliner bir bilim dalı olan toksikoloji, fizik, kimya, biyoloji, matematik, farmakoloji, fizyoloji, patoloji, biyokimya ve immünoloji gibi bir çok bilim dalı ile yakından ilişkilidir (Vural, 2005).

Kendi içerisinde çeşitli alt dallara ayrılan toksikolojinin en önemli alt dallarından biri de, genetik toksikoloji veya genotoksikolojidir. Genotoksikoloji, çeşitli fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA ve kromozomlar üzerine olan etkilerini inceler. Bu bağlamda DNA ve kromozomlarda hasar oluşturan toksik ajanlar genotoksin olarak adlandırılırken, DNA molekülü ve genotoksinlerin etkileşimi sonucu ortaya çıkan ve gelecek kuşaklara aktarılan toksisite ise genotoksisite olarak tanımlanmaktadır (Derelango ve Hollinger, 2002).

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte insanlar günlük yaşamlarında çok sayıda genotoksik ajanla karşı karşıya kalmaktadır. Günümüzde ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarım ilaçları ve plastikleştiriciler gibi pek çok madde kullanımının her

alandaki hızlı bir şekilde artması, bu maddelerin insan genomu üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olup olmadığının test edilmesini zorunlu hale getirmektedir. Örneğin alkileyici ajanlardan olan Mitomisin C (MMC) *Streptomyces caespitosus*'tan elde edilen oldukça güçlü antibakteriyel ve antitümör fungal bir antibiyotiktir. Pankreas, akciğer, uterus, serviks, kolon, mide, rektum ve mesane gibi pek çok kanser türünde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MMC'nin genotoksik etkiye neden olduğu fare spermatositlerinde mikronukleus testi ve kromozom aberasyon testleri gibi birçok farklı çalışmayla kanıtlanmıştır. Bunun dışında kemik iliği hücrelerinde ve *D. melanogaster*'de MMC'nin genotoksik etkilere neden olduğu rapor edilmiştir (Touati vd., 2013).

Bu kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında farklı canlı türlerini içeren çok çeşitli test yöntemleri geliştirilmiştir (Yüzbaşıoğlu vd., 2014). Moleküler ve kromozomal düzeyde olabilen genotoksisite testleri, etki mekanizmalarına göre *in vivo* veya *in vitro* olarak çalışılabilmektedir (Jena vd., 2001). Üreme hücrelerindeki veya somatik hücrelerdeki mutasyonları temel alan genotoksisite testleri ile, gelecek kuşaklarda kalıtsal hastalıklara neden olan, üreme yeteneğini olumsuz yönde etkileyen ya da somatik mutasyonlar ile karsinojenik etkili olan mutasyonlar belirlenebilmektedir. Bu çalışmalar sayesinde belirlenen mutasyonlar, DNA iplikçisindeki kırılmalar ve çeşitli kromozom hataları genotoksisitenin varlığını göstermektedir (Doğan, 2008). Moleküler düzeyde olan genotoksisite çalışmalarında, DNA'da oluşan hasarın direkt olarak belirlenebilmesi amacıyla yapılan komet testi, Ames Testi ve *Drosophila* testleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kromozomal düzeyde olan genotoksisite araştırmalarında ise kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (KA) ve mikronukleus (MN) analiz yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Kurtoğlu, 2010).

1.13. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

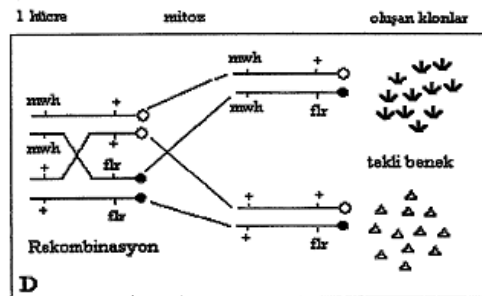
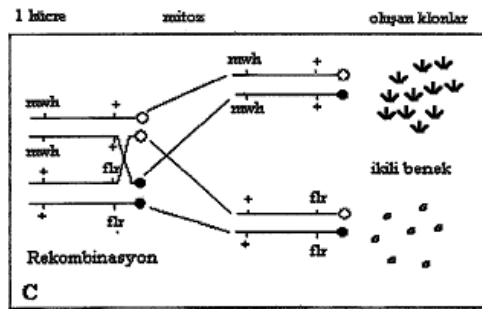
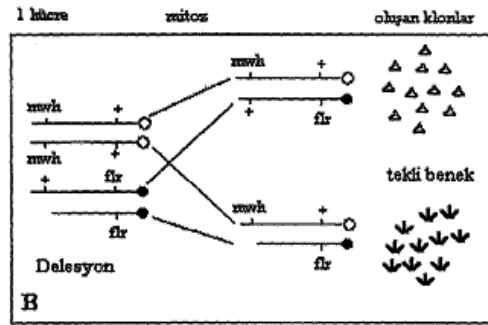
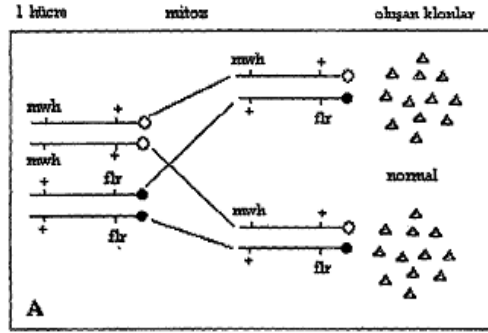
Somatik mutasyon ve rekombinasyon testleri (SMART), göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her iki test de nokta mutasyonları, delesyonlar, kromozom anomalileri ve mitotik rekombinasyonları belirlemede kullanılır. Kanatta mutasyona uğramış hücrelerin analizi, göze göre daha kolaydır (Graf vd., 1984). Uygun işaret genlerinin heterozigotluğunun kaybı esasına dayanarak geliştirilen bu testler, larvanın imajinal disklerinde mitotik olarak çoğalan büyük hücre gruplarını hedef almaktadır. Bu imajinal disk hücrelerinin herhangi

birinde genetiksel olarak bir değişim olursa, bundan sonraki oğul hücrelere bu değişim aktarılarak mutant hücre klonları oluşur. Oluşan bu genetiksel değişim, fenotipe yansıyan bir değişikliğe neden olursa, bu klonlar ergin bireyin kanatlarında ve gözlerinde mutant hücre benekleri şeklinde gözlenir. Çeşitli kimyasallara maruz bırakılan sineklerde indüklenmiş olan klonların toplam sayısı, uygulanan kimyasalın genotoksik etkisiyle ilgili sayısal sonuçlar verir. Ayrıca gözlenen klonların tipi, bu klonların oluşumda rol oynayan mutasyonal mekanizmaları ortaya çıkarır (Henderson, 2004).

Kanat benek testinde fenotipik olarak kanat üzerinde gözlenebilen iki işaret geni kullanılmaktadır. Bu genlerden biri çoklu kanat kılı (*mwh*) genidir. Mutant olan bu gen, üçüncü kromozomun sol kolunun uca yakın bölümünde lokalize olmuştur (3-0.3). Resesif bir gen olan *mwh* geni, homozigot olarak (*mwh/mwh*) yaşatılabilir. Homozigot olarak bulunduğu zaman hücre başına bir kanat kılı yerine, çoklu kanat kıllarının oluşumuna neden olur (Rodriguez-Arnaiz vd., 1996). Diğer işaret geni *flare* (*flr³*) ise kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif mutant bir gendir. Bu gen de üçüncü kromozomun sol kolunda fakat sentromere daha yakın (3-38.8) olarak yer alır. *Flare* geninin üç mutant aleli vardır ve hepsi homozigot letaldir (*flr* için homozigot olan zigotlar ergine gelişemez). Fakat heterozigot bir bireyin kanat imajinal disklerindeki homozigot hücreler yaşayabilir ve mutant kanat hücrelerine gelişir. Homozigot letaliteden ötürü *flr* alelleri inversiyonlar ve yine homozigot letal olan dominant işaret gen taşıyan dengeleyici bir kromozomla birlikte *flr³/TM3*, *Bd^S* stok olarak tutulur (Graf ve Singer, 1992).

Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde, iki ayrı çaprazlama kullanılmaktadır. Bunlardan biri standart çapraz (ST), diğeri ise promutajenlere karşı duyarlı olan yüksek biyoaktivasyon (YB) çaprazıdır. Standart çapraz için *flr³/TM3*, *Bd^S* soyundan toplanan virjin dişiler, *mwh* erkekleri ile çaprazlanır. Yüksek biyoaktivasyon çaprazında ise *ORR/ORR;flr³/TM3*, *Bd^S* soyunun virjin dişileri ve *mwh* erkekleri çaprazlanır. Bu çaprazlar sonucunda gelişen heterozigot larvalara, mutajenik etkisi araştırılmak istenen maddeler uygulanır. Bu larvalardan gelişen ergin sinekler kanatlarda beklenen somatik mutasyonu belirlemek amacıyla analiz edilir. Ergin bireyler fenotipik olarak ayırt edilebilen iki farklı fenotipe sahiptir;

- (1) Trans-heterozigot bireyler ($mwh\ flr^+ / mwh^+ flr$)³ fenotipik olarak yabanıl tip kanatlara sahiptir
- (2) Dengeleyici-heterozigot bireylerin ($mwh\ flr^+ / TM3, Bd^S$) kanat kenarları testere dişlidir. Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıda invazyon nedeniyle rekombinasyonlar engellenmiştir. Bu nedenle sadece *mwh* tekli benekleri ortaya çıkar (Graf ve Schaik, 1992).



Şekil 1.6. Tekli ve ikili beneklerin oluşumuna neden olan farklı genotoksik olayları gösteren genetik mekanizmalar (Rincon ve Graf, 1995). **A:** Normal kanat kıllarının oluşumu, **B:** Delesyon sonucu tekli benek oluşumu, **C:** Mitotik rekombinasyon sonucu ikili benek oluşumu, **D:** Mitotik rekombinasyon sonucu tekli benek oluşumu

Ergin bireylerin kanatları, mutant hücre klonlarını tespit etmek amacıyla kesilir ve mikroskop altında taranır. Gözlenen mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilir.

Tekli *flr3* veya *mwh* benekleri (küçük ve büyük benekler); nokta mutasyon (*flr+* yada *mwh+* da), kromozomal değişiklik (örneğin veya *flr+* veya *mwh+* delesyonu) ya da mitotik rekombinasyon olduğunu gösterir. Öte yandan ikili benekler (birbirine yakın duran *flr3* ve *mwh* hücreleri) özellikle mitotik rekombinasyon sonucu oluşur (Şekil 1.6). Bu nedenle ikili benekler, uygulanan maddenin rekombinasyon aktivitesi hakkında ön fikir verir. İstatistik analiz için benekler fenotipleri açısından büyük tekli benek, küçük tekli benek ve ikili benekler olarak sınıflandırılırlar.

Beneklerin farklı tipleri farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret gen (*mwh* ve *flr*) arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr* geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Watanabe vd., 1996).

Küçük benekler (bir ya da iki mutant hücre) pupada son bir-iki mitoz bölünme sırasında oluşurken, büyük benekler (üç ya da üçten fazla mutant hücre) daha erken, larva aşamasında oluşur. Ayrıca kromozomal aberasyonlar sonucu meydana gelen genetik bozukluklar, mutasyonun başlangıç zamanına bağlı olmaksızın çoğunlukla küçük klonlar olarak ortaya çıkar (Rincon ve Graf, 1995).

Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), somatik hücrelerde heterozigotluğun kaybı olarak değerlendirilen çok sayıda genetik olayın belirlenmesine olanak verdiğinden çok yönlü kullanılabilen *in vivo* bir testtir. Bu nedenle, SMART olası genotoksik maddeleri test etme olanağı sağlarken, doğal ya da sentetik çeşitli maddelerin olası antigenotoksik etkilerini araştırma olanağı da sağlamaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sarıkaya ve Memmi (2013), *Drosophila* Kanat Benek Testini kullanarak, pretroid grubu insektisitlerden olan metofluthrin ve transfluthrin'in genotoksik etkisini araştırmışlardır. Standart çaprazın kurulduğu çalışmada, üçüncü instar evresindeki larvalara, transfluthrin'in 0.0103 mg/mL ve 0.103 mg/mL, metofluthrin'in ise 6µg/mL ve 60µg/mL dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda transfluthrin'in kullanılan her iki dozunun, metofluthrin'in ise 60µg/mL dozunun *Drosophila*'da mutajenik ve rekombinojenik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir.

Demir vd. (2012), yaptıkları bir çalışmada ayçiçeği ve soya yağlarının kızartma ve kaynatma ürünlerinin genotoksik etkisini *Drosophila* SMART Testi kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada çekinik flare (*flr³*) ve çoklu kanat kılı (*mwh*) genlerini taşıyan üçüncü instar evresindeki heterozigot larvalar söz konusu yağların % 6, % 12 ve % 24 olmak üzere üç farklı konsantrasyonları ile kronik olarak beslenmişlerdir. Çalışma sonucunda kaynatma ve kızartma işlemine tutulmayan ayçiçek ve soya yağının genotoksik etkisi olduğu saptanmıştır. Üç kez olmak üzere 15, 30 ve 60 dakika süresince Ayçiçek yağı kaynatılmasından sonra güçlü genotoksik etkiler gözlenirken, ayçiçek yağı ile patates kızartılmasında bazı genotoksik etkiler gözlenmiştir. Öte yandan, üç kez olmak üzere onbeş, otuz ve altmış dakika süresince soya yağı kaynatılmasında özellikle altmış dakikada toplam klonlar için pozitif yanıt elde edilirken, soya yağı ile patates kızartılmasında otuz ve altmış dakikada bazı genotoksik aktiviteler elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan ayçiçek ve soya yağının kızartma ve kaynatma ürünlerinin *D. melanogaster*'de genotoksik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir.

Gargara ürünlerinden olan chloreksidin ve benzidamine-HCl'nin genotoksik etkisinin *Drosophila* SMART Testinin kullanarak karşılaştırıldığı bir çalışmada, çekinik flare (*flr³*) ve çoklu kanat kılı (*mwh*) genlerini taşıyan üçüncü instar evresindeki heterozigot larvalara chloreksidin'in 0.5, 1 ve 2 mg/mL, benzidamine-HCl'nin ise 0.38, 0.75 ve 1.5 mg/mL dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda gargara ürünlerinin uygulanmasına bağlı olarak sineklerin hayatta kalış oranlarının, kontrol grubuna oranla anlamlı oranda düşük olduğu ve bu ürünlerin *Drosophila*'da

toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, yapılan çalışmada her iki gargara ürününün de yüksek dozlarının kanat başına düşen mutasyonları arttırarak genotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Erciyas vd., 2010).

Carmona vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, civa bileşiklerinden olan civa II klorid (MC) ve metil civa klorid (MMC)'in genotoksik etkisi *Drosophila* SMART Testi ile araştırılmıştır. Çalışmada üçüncü instar evresindeki larvalara MC'nin 1 ile 50 μ M, MMC'nin ise 0.5 ile 5 μ M arasındaki dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda her iki civa bileşiğinin yüksek oranda toksik etkiye neden olduğu ancak küçük, büyük ve ikili benek sayılarında önemli bir artışa neden olmayarak genotoksik etki göstermediği rapor edilmiştir.

Obezite tedavisinde medikal amaçlı olarak kullanılan orlistat'ın mutajenik ve rekombinojenik etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, larvalara kronik olarak orlistatin 2.4, 4.8 ve 9.6 mg/mL olmak üzere üç farklı dozu uygulanmıştır. Hem standart çapraz (ST) hem de yüksek biyoaktivasyon çaprazının (HB) kurulduğu çalışmada, orlistatin kullanılan tüm dozlarının *Drosophila*'da rekombinojenik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Orsolin vd., 2012).

Andrade vd. (2014), elektronik, havacılık, inşaat, ilaç ve biyomedikal bilimler gibi çeşitli alanlarda sıkça kullanılan karbon nanotüplerinin (NT) insan sağlığı ve çevre bakımından güvenilirliğini test etmek amacıyla, bu malzemenin potansiyel toksisitesini ve DNA hasarını araştırmak için *Allium cepa* genotoksisite/mutajenite testini ve *Drosophila*'da SMART testini kullanmışlardır. Çalışmada üçüncü instar evresindeki larvalar NT'nin 64,160, 400 ve 1000 μ g/mL olmak üzere dört farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmışlardır. *Allium cepa* testi sonuçlarına göre, NT'nin önemli bir genotoksik ya da mutajenik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. SMART testi sonuçları incelendiğinde, tüm konsantrasyonlar için yaşama yüzdelerinin %90'ın üzerinde olduğu bildirilmiş ve negatif kontrol ile karşılaştırıldığında NT'nin *Drosophila*'da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı ve NT'den kaynaklanan herhangi bir DNA hasarının olmadığı rapor edilmiştir.

Guterres vd (2013), *Ocotea acutifolia* bitkisinden elde edilen 5 alkoloidin, *Drosophila*'da mutajenik ve rekombinojenik aktivitesini SMART testini kullanarak araştırmışlardır. Çalışmada alkoloitler, üçüncü instar evresindeki larvalara kronik olarak uygulanmıştır. Çalışma sonucunda alkoloitlerin doza bağlı olarak genotoksik

etki gösterdiği tespit edilmiş, bazı alkoloitlerin mitotik rekombinasyonu indüklediği rapor edilmiştir.

2.2. Çalışmada Kullanılan Çevresel Kimyasallar ile İlgili Yapılan Toksisite ve Genotoksisite Çalışmaları

Watts vd. (2001) BFA'nın Diptera sınıfına mensup sucul bir böcek olan *Chironomus riparius*'un gelişimi ve üremesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 78 ng/L ile 0.75 mg/L arasındaki dozlarla uygulanan BFA'nın, pupadan çıkış zamanında istatistiksel olarak anlamlı bir gecikmeye neden olduğunu ve erginlerin pupadan çıkış yüzdesini azalttığını bildirmişlerdir.

Başka bir çalışmada, araştırmacılar BFA'nın büyüme, gelişme ve eşey oranı üzerine etkilerini *Musca domestica* (kara sinek) üzerinde araştırmışlardır. Bu çalışmaya göre, BFA'nın 100 µg/kg ve 1000 µg/kg'lık konsantrasyonlarının uygulanması yumurtadan larvaya ve larvadan pupaya geçiş oranlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmış ve pupadan çıkış sürelerini geciktirmiştir. Ayrıca doz artışına bağlı olarak pupal ağırlıkta azalma olduğunu rapor edilmiştir (Izumi vd. 2008).

Pickford vd. (2003) BFA'nın, Afrika pençeli kurbağası *Xenopus laevis*'in büyüme, gelişme ve eşeyssel farklılaşması üzerine etkisini incelenmiştir. Çalışmada 17b-estradiol (E2) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışma kapsamında *Xenopus laevis* larvalarına BFA'nın 0.83-497 µg/L arasındaki dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda BFA'nın uygulanan dozlarının *Xenopus laevis*'in larval büyüme, gelişme ve eşeyssel farklılaşması üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir.

Liu vd. (2012) TBT'nin *Xenopus tropicalis* embriyoları üzerinde teratojenik etkisini araştırmışlardır. Bu bağlamda *Xenopus tropicalis* embriyoları 72 saat boyunca tribütildin kloridin 50, 100 ve 200 ng/L'lik dozlarına maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda TBT'nin anormal göz gelişimi ve yüzgeç eksikliği gibi birtakım histolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir.

Ang Yu vd. (2013) TBT'nin nörotoksik etkisini *Sebastiscus marmoratus* üzerinde araştırmışlardır. Çalışma kapsamında TBT'nin 10, 100 ve 1000 ng/L'lik dozları uygulanmıştır. 50 günlük uygulama sonucunda TBT maruziyetine bağlı olarak balıklarda depresif yırtıcı davranışlar gözlenmiştir. Kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında, TBT maruziyeti sonucu doz artışına bağlı olarak beyinde dopamin seviyesinde artış saptanırken, 5-hidroksitriptamin ve norepinefrin seviyesinde önemli bir azalış olduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonucunda TBT'nin merkezi sinir aktivitelerini etkileyerek balıklarda depresif yırtıcı davranışlara neden olabileceği rapor edilmiştir.

Peranandam vd. (2010) TBT'nin tatlı su karidesi *Macrobrachium rosenbergii*'nin embriyonik gelişim, büyüme ve kuluçka üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada TBT'nin 0.78 ppm, 1.56 ppm ve 3.12 ppm'lik dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda 3.12 ppm uygulamasından sonra yumurta kuluçkasının azaldığı ve embriyonik gelişimin geciktiği rapor edilmiştir. 0.78 ppm'lik uygulama sonucunda ise embriyonik gelişim ve kuluçkada önemli bir değişiklik gözlenmemiştir.

Ferreira vd. (2013) organotin bileşiklerinden monobütiltin (MBT), dibütiltin (DBT) ve tribütiltin (TBT)'in toksik etkisini *in vitro* olarak insan nöroblastoma hücre hattında değerlendirmişlerdir. Çalışmada, hücre canlılığı ve çoğalmasının inhibisyonu, F-aktin, DNA fragmantasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi gibi değişikliklerle mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişiklikler gibi birkaç belirteç kullanılarak hücre ölümü mekanizması araştırılmıştır. Çalışmada 0.1–1 µM gibi çok düşük konsantrasyonlarda bile DBT ve TBT'nin oldukça toksik olduğu saptanırken, MBT'nin yüksek dozlarının hafif sitotoksik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir. En toksik etkiye sahip olan TBT'nin uygulanan yüksek konsantrasyonlarında laktat dehidrogenaz salınımına neden olduğu rapor edilmiştir.

Madoka vd. (2005) TBT'nin eşeyler arasındaki akut toksisitesini karşılaştırmak amacıyla, caprellid amphipods'ların 5 türü TBT'nin 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 µg/L dozlarına 20°C'de 48 saat maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda eşeyler arasında TBT'nin akut toksisitesinde belirgin bir farklılık gözlenmediği tespit edilmiştir.

Park vd. (2013) TBT'nin potansiyel ekolojik riskini değerlendirmek amacıyla *Gomphina veneriformis*'da büyüme oranı, gonad indeksi, cinsiyet oranı, interseks gonadlar yüzdesi, filtrasyon hızı ve solungaç anormallikleri gibi çeşitli biyolojik yanıtları araştırmışlardır. Ayrıca çalışma kapsamında, uygulanan TBT

konsantrasyonlarına bağı olarak gözlenen çeşitli biyokimyasal ve moleküler yanıtlar araştırılmıştır. Çalışmada doz artışına bağı olarak TBT'nin *Gomphina veneriformis*'da büyümei geciktirdiğı saptanmıştır. Ayrıca TBT uygulamasından sonra gonad indeksinde azalma ve cinsiyet dengesinde değışme olduğı rapor edilmiştir.

Chen vd. (2008) TBT'nin farelerde spermatogenez üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmada fareler TBT'nin 0.5, 5, and 50 µg/kg olan oldukça düşük dozlarına maruz bırakılmıştır. 30 günlük TBT maruziyeti sonucunda farelerde gonadosomatik indeksin (GSI) önemli derecede azaldığı saptanmıştır. Çalışma sonucunda testislerde testosteron seviyesinin değışmediğı gözlenirken, doza bağı olarak 17β-östradiol seviyesinde önemli bir azalma olduğı ve TBT uygulaması sonucunda testislerde sperm oluşumunun önemli bir şekilde inhibe edildiğı rapor edilmiştir.

Zhang vd. (2013) TBT'nin, kaya balığı *Sebastiscus marmoratus* yumurtalıklarında lipit birikimi ve testosteron esterleşmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma kapsamında TBT uygulamasına bağı olarak yumurtalıklarda esterlenmiş şekilde bulunan testosteron seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiş ve bu azalmanın serbest testosteron seviyesinde ki artışa bağı olarak gerçekleşmiş olabileceğı öne sürülmüştür. Yapılan çalışma sonucunda TBT uygulamasının *Sebastiscus marmoratus*'un yumurtalık fonksiyonunu ve yumurta gelişimini etkileyebileceğı rapor edilmiştir.

Zhang vd. (2003), Crustacea sınıfına mensup olan *Daphnia magna* erginlerine 50 µg/L konsantrasyonunda 4-NF uygulaması yaparak, yenidoğan bireylerde gelişimsel bir takım anormalliklerin olduğunu ancak fekundite ve eşey oranında herhangi bir değışiklik olmadığını rapor etmişlerdir.

Atlı (2010) yaptığı çalışmada, bisfenol A (BFA), 4-nonilfenol (4-NF) ve 4-tert-oktilfenol (4-tert-OF)'ün *Drosophila melanogaster*'in gelişim biyolojisi ve ömür uzunluğuna etkilerini araştırmıştır. Larvalar söz konusu olan kimyasalların 0.1 mg/L, 1mg/L ve 10mg/L'lik konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda uygulanan kimyasalların *Drosophila melanogaster*'in gelişim biyolojisini, yumurta verimini ve ömür uzunluğunu çeşitli şekillerde etkilediğı rapor edilmiştir.

Güney vd (2007) sıçanlarda subkronik olarak uygulanan methidatyonun (MD)'un toksisitesine karşın, E ve C vitaminlerinin iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda MD uygulamasına bağlı olarak, serum malondialdehit (MDA) seviyesinde kontrol grubuna göre önemli bir artış olduğu görülmüştür. Uygulama yapılan vitamin+MD gruplarında ise MDA seviyesinde önemli ölçüde azalma olduğu bildirilmiştir. Ayrıca kontrol grubuyla karşılaştırıldığında vitamin+MD grubunda daha az olmakla birlikte, hem MD, hem de vitamin+MD gruplarında kolinesteraz (ChE) aktivitesinde önemli oranda bir azalma olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak subkronik MD uygulamasının ovaryumda hasara neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca MD uygulamasının, MD'nin toksisitesiyle ilişkili moleküler bir mekanizmayla lipid peroksidasyonuna neden olduğu rapor edilmiştir.

Methidatyonun, hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada methidatyonun toksik etkisi, *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* ve *Xenopus laevis* üzerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Toksik etkinin erken belirtileri olarak, GST, AChE, CaE, GR, LDH ve AST enzim aktiviteleri, 96 saat süreyle methidatyona maruz bırakılan 4 günlük iribaşlarda tayin edilmiştir. Çalışma sonucunda 3.2 mg aktif içerik (AI)/L methidatyon konsantrasyonuna maruz kalan *P. ridibundus*, *P. viridis* ve *X. laevis* iribaşlarında, GST aktivitesinin indüklendiği, AChE aktivitesinin ise inhibe edildiği bildirilmiştir (Güngördü, 2013).

Moura vd (2011), meyvelerde kullanılan pestisitlerin *Chrysoperla externa* üzerindeki toksik etkisi araştırılmıştır. Çalışma kapsamında incelenen MD'nin, erginlerde yumurtlama üzerine etkisinin yanı sıra, larva ve pupaların hayatta kalmaları üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda larvalara uygulanan MD'nin tüm larvaların ölümüne neden olduğu saptanmış ve *C. externa* üzerinde toksik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir.

Takayasu vd (2012), organofosfatlı bir pestisit olan MD'nin oral yoldan alınması ile oluşan ölümcül zehirlenme vakası üzerine çalışmışlardır. 80 yaşında yatağında ölü bulunan bir adamın yapılan adli otopsisinde sonucunda kayda değer herhangi bir morfolojik değişiklik saptanmadığı, ancak toksikolojik tarama testlerinde mide içerisinde MD ekstraktlarına rastalandığı bildirilmiştir. Kalp kanı, periferik kan, idrar, beyin, akciğer ve karaciğer gibi vücut sıvıları ve organlarda da

yüksek oranda MD'ye rastlanmıştır. Bu sonuçlar kurbanın oral yoldan MD'ye maruz kaldığını güçlü bir şekilde desteklediği bildirilmiştir. Toksikolojik veriler ve otopsi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, ölüm nedeninin MD emülsiyonuna bağlı akut zehirlenme olduğu rapor edilmiştir.

Boyacıoğlu vd (2007), yaptıkları bir çalışmada yüzey suları, denizler, yer altı suları ve sucul sedimentte yüksek oranlarda bulunan NF'nin mutajenik etkisini test etmişlerdir. Mutajenik etkinin belirlenmesi amacıyla NF'nin 0.937- 4.685 µg/L aralığında değişen altı farklı konsantrasyonu, test sistemi olarak seçilen *Salmonella thyphimurium* TA98 ve TA 100 suşları üzerinde (metabolik aktivasyonsuz) test edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda NF'nin tüm konsantrasyonlarının toksik etkiye sahip olduğu ancak mutajenik etki göstermediği saptanmıştır.

Göze vd (2000), DES'in kromozomlar ve genital organlar üzerindeki histopatolojik etkilerini değerlendirmek amacıyla, bir, iki ve üç aylık sürelerle farelere 6µg/gün dozunda DES uygulaması yapmışlardır. Uygulamalar sonucunda farelerin kromozomlarındaki toplam sayısal ve yapısal anomaliler, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde bir artış gözlemlendiği rapor edilmiştir.

2.3. Çalışmada Kullanılan Çevresel Kimyasalların Östrojenik Etkileri ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Bir böcek türü olan *Chironomus riparius*'ta BFA (5, 50 ve 500 µg/L)'nin ve NF (1, 10 ve 100 µg/L)'nin ERR gen ifadesi üzerine etkisi araştırıldığı bir çalışmada, *C. riparius* larvaları kısa periyot (24 saat) ve uzun periyot (96 saat) olmak üzere farklı konsantrasyonlarda BFA'ya maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda ERR gen ifadesi gerçek zamanlı PZR ile analiz edilerek, hem kısa periyot, hem de uzun periyot uygulamalarında BFA'nın doza bağlı olarak ERR gen ifadesinde önemli bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Park ve Kwak, 2010).

Zhang vd., (2013) tarafından yapılan bir çalışmada TBT'nin; 1, 10 ve 100 ng L⁻¹ konsantrasyonlarının *Sebastiscus marmoratus* erkeklerinde östrojen reseptörü olan ER gen ifadesini konsantrasyona bağlı olarak etkilerken, dişi bireylerde gen ifadesi üzerine herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. *S. marmoratus* erkeklerinde TBT'nin 1 ve 10 ng L⁻¹ konsantrasyonunun ERα gen ifadesini önemli oranda arttırdığı, en yüksek konsantrasyon olan 100 ng L⁻¹'nin ise gen ifadesi üzerine

herhangi bir etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir. Aynı konsantrasyonların ER β gen ifadesi üzerine etkileri araştırıldığında ise sadece 1 ng L⁻¹ konsantrasyonunun gen ifadesini arttırdığı, diğer konsantrasyonların ER β üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir.

DES'in ER ve ERR gen ifadesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farelere uygulanan 1 μ M DES'in ERR β 'nin ifadesini inhibe ederken, ER α , ER β ve ERR γ üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir. 10 μ M DES uygulmasının ise ER α , ER β 'nin gen ifadesini önemli ölçüde arttırdığını, ERR α , β ve γ gen ifadelerini ise azalttığı rapor edilmiştir. Bu çalışma sonucunda DES kaynaklı adipojenik etkilerin ER aracılığıyla ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Hao vd., 2012).

NF'nin östrojenik etkisini belirlemek için yapılan bir çalışmada, *Solea solea*'ya uygulanan kısa süreli 10⁻⁶M NF'nin, ksenoöstrojenlerin östrojenik etkisini belirlemede biyobelirteç olarak kullanılan plazma vitellojen seviyesinde ve ER β gen ifadesinde önemli oranda bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Palermo, 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Organizma ile İlgili Genel Bilgiler

Hayvanlar aleminin Insecta sınıfına dahil olan *Drosophila*, *Diptera* takımının *Drosophilidae* (sirke sinekleri) familyası içerisinde yer alır. Larvaları özellikle ekşiyen meyveler üzerinde geliştiği için meyve sinekleri olarak da adlandırılan bu familya, genetiksel çalışmalarda deney hayvanı olarak kullanılan *Drosophila melanogaster*'i de içeren pek çok türü kapsamaktadır (Wheeler, 1981).

Alem	: Animalia
Şube	: Arthropoda
Altşube	: Mandibulata – Antennata
Sınıf	: Insecta – Hexapoda
Alt sınıf	: Pterygota
Üst takım	: Mecopteroidea
Takım	: Diptera
Alt takım	: Brachycera
Aile	: <i>Drosophilidae</i>
Cins	: <i>Drosophila</i>
Tür	: <i>Drosophila melanogaster</i>

İlk olarak 1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılmaya başlanan *Drosophila melanogaster*'in tercih edilmesini sağlayan ve diğer organizmalardan ayıran pek çok özelliğini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz: (Gui ve Grant, 2008; Rincon ve Graf, 1995; Graf ve Würgler, 1996).

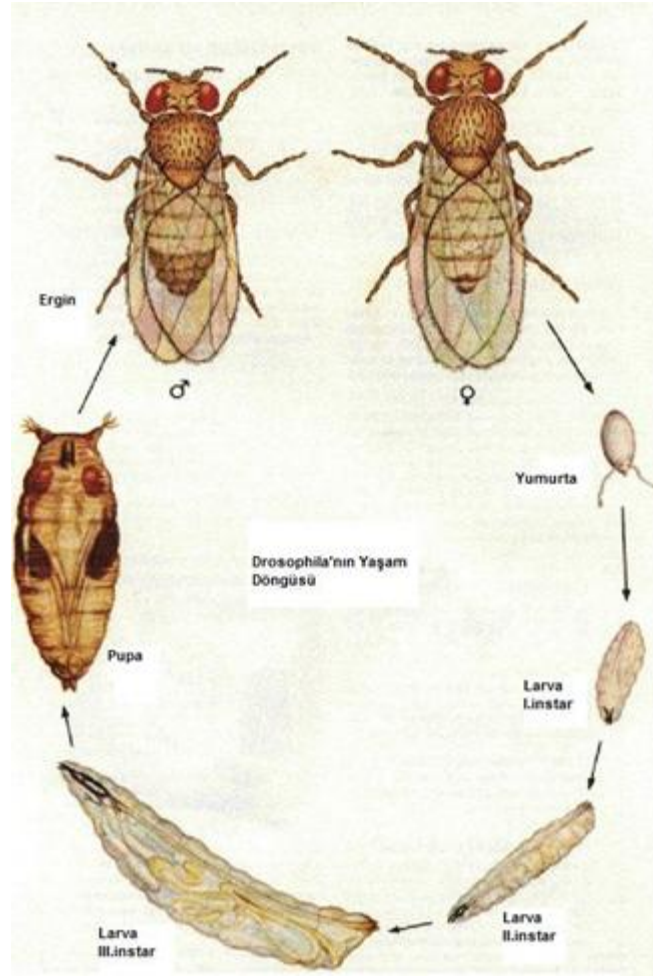
- Kısa generasyon zamanlı, ökaryotik bir organizmadır. Yumurtadan çıktıktan sonra $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ve % 40- 60 bağıl nemde yaklaşık 9-10 günde ergine gelişip üremeye başlar.
- Gelişimleri tam metamorfozlu olan holometabol canlılardır.
- Arı döl olarak saklanabildikleri için, kontrollü çaprazların yapılabilmesine olanak sağlayan en uygun organizmalardan biridir.

- Çok sayıda çeşitlilik gösteren doğal yada mutant varyasyonların gözlemlendiği bir organizmadır. Mutant bireylerde göz rengi, göz şekli, vücut rengi yada kıl tipi gibi farklı fenotipik karakterler çıplak gözle yada binoküler mikroskop altında kolaylıkla incelenebilir.
- Küçük organizmalar olduklarından, laboratuvarında kültür ortamında çok sayıda üretilmeleri oldukça kolay ve ekonomiktir.
- Dişi *Drosophila* günde ortalama 40-50 yumurta bırakabilir. Genetiksel özellikleriyle ilgili bilginin doğru belirlenmesi ve elde edilen verilerin güvenilirliği açısından, fazla sayıda döl elde edilebilir olması büyük önem taşımaktadır.
- Işık mikroskobu altında kolaylıkla incelenebilen 4 çift kromozoma sahip olmasının yanı sıra, üçüncü evre larvalarının tükrük bezlerinde dev kromozomlar (politen kromozomlar) bulunur. Bu kromozomlar kromozom haritaları ve kromozom fonksiyon analizleri gibi sitogenetiksel çalışmalarının yapılmasını sağlar.
- Genetik olarak aktif olan türlerde promutajen ve prokarsinojenlerin geniş bir dizisinin değiştirilmesi için potansiyel enzimatik aktiviteye sahip olan *Drosophila*, aynı zamanda memelilerinkine benzeyen bir detoksifikasyon sistemine de sahiptir.
- *Drosophila* genom dizi analiziyle, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğu gösterilmiştir. *Drosophila* ve insan hücre siklusunun ve düzenleyici yolların benzerliği, tümör genezisde çoğalma süreci çalışmalarında bir model olarak hizmet etmektedir (Bernards ve Hariharan, 2001; Potter vd, 2000).

3.1.1. *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Üç çifti otozomal, bir çifti de gonozomal olmak üzere toplam dört çift kromozom taşıyan ve tam metamorfoz geçiren meyve sineklerinin hayat döngüsü yumurta, larva, pupa ve ergin olmak üzere dört farklı evreye sahiptir (Şekil 3.1). *Drosophila*'nın ideal yaşam şartları $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve %40-60 bağıl nem ortamıdır ve bu şartlarda yumurtadan ergine gelişme süreleri ortalama 9-10 günlük bir süreyi kapsamaktadır (Graf vd., 1984). *D. melanogaster*'in yaşam döngüsü ve ömür

uzunluğu; sıcaklık, beslenme, çiftleşme, popülasyon yoğunluğu, radyasyon ve nem gibi çeşitli şekillerde etkilenmektedir (Hamamcı, 1993).



Şekil 3.1. *Drosophila*'nın yaşam döngüsü

Drosophila melanogaster dişileri pupadan çıktıktan yaklaşık 2-3 gün sonra yumurta bırakmaya başlarlar. Gelişimini tamamlamış bir yumurta görünüş ve boyut bakımından türden türe çeşitlilik göstermekle birlikte, yaklaşık 0.5 mm uzunluğunda olup beyaz renklidir. Yumurtanın döllenmesi uterusu gerçekleşir ve dişi yumurtalarını döllenmeyi takiben hemen besiyerine bırakır ya da embriyo gelişiminin ilk dönemlerini uterusu geçirir. Yumurtanın dış tarafı folikül epiteli tarafından salgılanan ve yumurtayı koruyan koriyon adı verilen bir zarla çevrilidir. Anterior ucunda dorsalden uzanan bir çift filament, yumurtanın bırakıldığı yumuşak besin ortamına batmamasını sağlar. Yumurta açılmasını takiben çıkan larva, pupa oluşumuna kadar iki defa gömlek değiştirir. İki gömlek değiştirme arasında kalan peryota instar denir (Demirsoy, 1982; Clark ve Rockstein, 1964). Böylece larval yaşamda yumurtadan çıkma ile ilk gömlek değiştirme 1. instar, ilk gömlek değiştirme

ile 2. gömlek değiştirme arası 2. instar ve ikinci gömlek değiştirmeden sonra pupalaşmaya kadar 3. instar olarak adlandırılmaktadır. Bu instarların süreleri; 1. instar 1 gün, 2. instar 1 gün ve 3. instar 2-3 gündür. Larva 3. instar döneminde yaklaşık 4-4.5 mm uzunluğunda olabilir (Ashburner vd, 1978).

Embriyonal gelişim sırasında gözlenen ve imaginal disk olarak adlandırılan yapılar, larva dönemi boyunca mitoz bölünmelerle pupa evresine kadar çoğalarak pupa evresinde erginin farklı organlarını oluştururlar. *Drosophila* ergin yapılarının birçoğu imaginal disklerden gelişir; bunlar erken larva gelişimi sırasında saptanır. Bu ergin yapılar, ağız parçaları, antenler, gözler, kanatlar, halterler, bacaklar ve dış genital organlarını içerir. Örneğin, göz bir göz imaginal diskinden, kanat bir kanat imaginal diskinden meydana gelir. 1. instar evresinde kanat diskinde yaklaşık olarak 50-100 hücre bulunurken, erken pupa evresinde kanat farklılaşmasının başlamasıyla birlikte hücre sayısı yaklaşık olarak 30000'e ulaşır. 3. instarın sonuna gelindiğinde larvalar beslemelerini tamamlayarak besiyerini terkeder ve bulunduğu kabın kuru yerine geçer. Prepupal dönem olarak adlandırılan bu evrede larvalar bulundukları kabın duvarına tırmanırlar. Ektisteroid hormonunun artışına paralel olarak kendilerini çevreleyen kütikül sertleşir ve böylece pupa dönemine geçmiş olurlar. Başta beyaz renge sahip olan pupa birkaç saat sonra sarı-kahve rengi alır. Pupadan ergin bir bireyin gelişebilmesi için gerekli olan dönüşümler $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve % 40-60 bağıl nemde yaklaşık olarak 4-5 günde tamamlanır. İlk başta beyaz olan pupanın rengi giderek koyulaşır, kıvrılmış halde olan kanatlar iki koyu eliptik yapı olarak görülebilir ve göz pigmentleri belirginleşir. Ergin birey pupanın anteriorunu delerek ortaya çıkar. Pupadan yeni çıkan ergin birey ilk birkaç saat açık renkli, pigmentsiz, kırık kanatlı ve uzun vücutludur. Pigmentasyonun gerçekteşmesinden sonra renkleri koyulaşmaya başlayarak kırık olan kanatlar ağılarak normal ergin görünümünü alırlar. Pupadan çıkan erkek bireyler bir-iki saat içerisinde eğeyssel olgunluğa erişirler. Dişi bireylerin eğeyssel olgunluğa erişebilmeleri için 3-3.5 saatlik bir zaman dilimine gereksinim vardır. Eğeyssel olgunluğa erişen dişiler çiftleşme olmaksızın yumurta bırakabilirler. Ancak sadece döllenmiş yumurtalar ağıılır (Ashburner vd, 1978).

Ergin bireylerde vücut baş (kaput), göğüs (thorax) ve karın (abdomen) olmak üzere üç kısma ayrılır. Eğeyssel dimorfizme bağlı olarak abdomen dişi ve erkek bireylerde farklılık göstermektedir. Dişi bireylerde abdomen yedi segmentli olup,

uzun ve uç kısmı sivri iken, erkek bireylerde beş segmentli olup, uç kısmı küt ve siyahtır. Ayrıca dişinin sürekli olarak yumurta bırakması ve yaşlanmasına bağlı olarak abdomen genişler. Bu özelliklere bağlı olarak dişi ve erkek bireylerin ayrımı gerçekleştirilebilir. Ancak pupadan yeni çıkan erkek bireylerde abdomendeki pigmentasyon yoğunlaşmadığı için dişi birey seçiminde yanılgılar olabilir. Cinsiyetin tam olarak anlaşılabilmesi için, erkek *Drosophila*'ların birinci çift bacağındaki bulunan ve eşey tarağı olarak adlandırılan koyu renkli sıra sıra dizilmiş kıllar karakteristiktir. (Falakalı, 1989; Graf ve Singer, 1992).

3.2. Çalışmada Kullanılan *Drosophila* Stoklarının Genetiksel Özellikleri

Çalışmada kullanılan normal metabolik aktiviteye sahip stoklar Temmuz 2005 tarihinde Brezilya Federal do Rio Grande do Sul Üniversitesi Genetik Bölümü'nden Heloisa Helena Rodrigues de Andrade tarafından gönderilmiş ve o tarihten itibaren bölümümüzdeki *Drosophila* için ideal yaşama koşulları olan 25 °C'de % 60 bağıl nem ortamının sağlandığı insektaryumda standart besin ortamında kültüre alınarak genetik yönden homojen olarak yetiştirilmektedir. Somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirlemek için bu stokların üçüncü kromozomları üzerinde bulunan iki belirleyici gen kullanıldı. Stokların genetik yapısı şöyledir;

1. $flr^3 / ln (3LR) TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e^s Bd^S$ bu stok kısaca $flr^3 / TM3,$

Bd^S olarak gösterilmektedir.

2. mwh/mwh

flr^3 geni fenotipte çeşitli şekillerde bulunabilir. Sineklerin kanatlarında bulunan normal, düz yapılı ve uzun kıllar yerine, oldukça kısa ve nokta şeklinde, koyu renkli balon şeklinde veya kalın yapılı, düzgün olmayan bir şekilde bulunabilir (Rincon ve Graf, 1995).

3.3. Çalışmada Kullanılan Çapraz

Çalışmada standart çapraz (ST) kuruldu. Standart çaprazı kurmak için $flr^3 / TM3, Bd^S$ soyunun bakire dişileri ile mwh soyunun erkekleri kullanıldı (Rincon ve Graf, 1995).

3.4. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan, *Drosophila* besiyeri Carolina Biological Supply Company'den, dietileter Merck'ten, Mitomisin C Serva'dan, 4-n-Nonilfenol Alfa Aeser'dan, Bisfenol A, Tribütültin klorid, Dimetilsülfoksit, Dietilstilbestrol, 17- β östradiol ve Methidatyon ise Sigma firmasından temin edildi.

3.4.1. Deney Koşulları

Çalışmada kullanılan tüm stok kültürleri ve deney sistemleri $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklık ve % 40-60 bağıl nem ve karanlık ortama sahip Biyoloji Bölümü'ndeki insektaryumda tutuldu. Çalışmalar sırasında yalnızca erginlerin seçilmesi ve transferi, larva toplama ve preparat hazırlama işlemleri aydınlık ortamda yapıldı.

3.4.2. Besiyerinin Hazırlanışı

Çalışmalar sırasında *Drosophila* kültürlerinin muhafaza edilmesi, çoğaltılması ve çaprazlanması aşamalarında Bozcuk tarafından geliştirilen standart besiyeri kullanıldı (Bozcuk, 1976). Kanat benek testinin bir bölümünde ve gen ifadesi çalışmaları için larva toplanması aşamalarında ise hazır *Drosophila* besiyeri kullanıldı. Standart besiyeri mısır unu, toz şeker, bira mayası, agar agar ve asit karışımından oluşmaktadır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Standart *Drosophila* besiyeri için gerekli olan malzemeler ve miktarları (Bozcuk, 1976).

Malzeme	Miktar
Mısır Unu	52 g
Şeker	47 g
Maya	9,5 g
Agar	3 g
Asit Karışımı	3 mL
Distile Su	510 mL

Besiyerinde kullanılan asit karışımı orto fosforik asit, propiyonik asit ve distile sudan oluşmaktadır (Çizelge 3.2). Bu asit karışımı besiyerinde oluşabilecek kontaminasyonu engellemek amacıyla antifungal olarak kullanılmaktadır. Bu karışım

kullanılmadığı zaman besiyeri fungus ile kontamine olacağından, bireylerin gelişimi olumsuz yönde etkilenmektedir. Ayrıca kontaminasyona bağlı olarak dışilerde yumurta verimi de düşmektedir. Asit karışımı stok olarak hazırlanır ve besiyeri pişirildikten sonra stok iyice çalkalanarak belirli miktarlarda ortamına eklenir.

Çizelge 3.2. Standart *Drosophila* besiyeri için gerekli olan asit karışımında kullanılan malzemeler ve miktarları (Bozcuk, 1976).

Malzeme	Miktar
Ortofosforik asit	83 mL
Propiyonik asit	386 mL
Distile Su	1081 mL
Toplam	1550 mL

Besiyeri hazırlanırken asit karışımı hariç gerekli tüm malzemeler ve distile su yeterli büyüklükteki ateşe dayanıklı bir kap içerisine konuldu ve karıştırılarak kaynaması sağlandı. Karışım kaynamaya başlayınca yaklaşık 10 dakika kadar daha kısık ateşte karıştırılarak pişirildi. Ateşten indirilen besiyerine gerekli miktarda asit karışımı ilave edilerek asidin homojen dağılması için iyice karıştırıldı. Bu şekilde hazırlanan besiyeri soğumadan steril olarak bekletilen 250 mL'lik kültür şişelerine yaklaşık 1-2 cm yükseklikten döküldü. Şişelerin üzerleri temiz kurutma kağıdı ile kapatılarak, besiyerleri soğuyup, katılaşmaya bırakıldı. Yaklaşık bir gün sonra besiyeri katılaşınca şişelerin ağzı hidro fob pamuk ve gazlı bezden yapılmış olan steril tamponlar ile kapatıldı. Hazırlanan besiyeri üç gün içerisinde kullanılmadığı takdirde bozulacağından, larva toplama aşamasına kadar yapılan deneyler için, her seferinde taze besiyerleri hazırlandı.

Çalışmamızın larva toplama aşamasında Carolina Biological Supply Company'den temin edilen hazır besiyeri kullanıldı. Bunun için 7.5 cm yüksekliğinde 2.5 cm çapında steril olarak bekletilen cam tüplere 0.5'er gram hazır besiyeri konuldu. Bu besiyerine daha sonra distile su, mutajen ve kimyasal madde çözeltileri çalışma gruplarına uygun olarak eklendi.

3.4.3. Bayıltma Yöntemi

Çalışmaların çeşitli aşamalarında, ergin bireyler bayıltıldı. Bu amaçla laboratuvarımızda eterizasyon yöntemi kullanılmaktadır. Bayıltma işleminde, hidrofob pamuğa gazlı bez sarılarak hazırlanmış tampon ile kapatılan bir kültür şişesi “bayıltma şişesi” olarak kullanıldı. Tampona bir kaç damla eter damlatılarak kültür şişesindeki sineklerin bu şişeye aktarılması sağlandı. Eterli tamponla kapatılmış bayıltma şişesinde birkaç dakika kalan sinekler baygın halde beyaz bir seramik üzerine alınarak gerekli çalışmalar yapıldı.

3.4.4. Standart Çapraz için Ergin Bireylerin Seçimi ve Larva Toplanması İşlemleri

Uygulamaların yapılacağı trans-heterozigot larvaları elde etmek amacıyla, erkek *mwh* bireyleri ile bakire (virjin) *flr3* dişi bireyleri kullanılarak çaprazlamalar yapıldı. Bakire dişi bireylerin toplanabilmesi için, *flr3* stoğunun bulunduğu kültür şişesindeki ergin bireyler ortamdan uzaklaştırıldı. Hiç ergin bireyin bırakılmadığı *flr3* kültür şişesinden 3 saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplanarak yeni besiyerine aktarıldı. Bireylerin yaşı üreme verimi üzerine etkili olduğundan benzer şekilde *mwh* stoğundan genç erkek bireyler seçilerek farklı bir besiyerine aktarıldı. Yeterli sayıda birey toplandıktan sonra taze besiyeri kullanılarak standart çapraz yapıldı. Döllenmenin ve embriyogenezin gerçekleşebilmesi için bireyler bir gün süre ile çaprazlama şişesinde bırakıldı. Çaprazlanan bireyler yeni bir besi yerinde sekiz saat bekletilerek, yumurta bırakmaları sağlandı. Bu süre sonunda erginler yumurta bıraktıkları besiyerinden uzaklaştırılarak farklı bir kültür şişesine alındı.

Besiyerine bırakılan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvaların üçüncü instar evresine erişmesi için 72 ± 4 saat beklendi ve besiyeri ortamı % 17 lik NaCl çözeltisi ile yıkanarak besiyerindeki larvaların ayrılması sağlandı. Larvaları içeren tuz çözeltisi kurutma kağıtlarının üzerine alındı ve larvalar zarar verilmeden sayılarak toplandı. Toplanan larvalar içerisinde 0.5 g hazır besiyeri ve 2.5 ml test solüsyonu bulunan 2.5 cm X 7.5 cm ebatındaki cam tüplere aktarıldı. Kontrol ve uygulama grupları için aynı işlemler tekrarlandı.

3.4.5. Mutajen ve Çevresel Kimyasal Çözeltilerinin Hazırlanması ve Besiyesine Eklenmesi

Çalışmada mitomisin C ve çevresel kimyasalların doz taramaları yapılarak uygulama dozları belirlendi. Mitomisin C'nin farklı üç dozu, çevresel kimyasalların ise genotoksik etkilerini belirlemek için değişen sayıda farklı dozları kullanıldı. Çalışmada ilk olarak kullanılan her bir madde için farklı derişimlerde stok çözeltiler hazırlandı.

Mitomisin C'nin stok çözeltisinin distile su ile hazırlanmasına karşın, methidatyonun stok çözeltisi dimetilsülfoksit (DMSO) ile, diğer çevresel kimyasalların stok çözeltileri ise etil alkolle hazırlandı. Her stok için gerekli olan miktarlar, elektronik bir terazide tartılarak uygun büyüklükteki koyu renk saklama şişelerine alındı ve üzerlerine hesaplanan hacimde distile su, DMSO veya etil alkol eklendi. Ardından bu stok çözeltilerden gerekli hesaplamalar yapılarak belirlenen uygulama dozları distile su ile hazırlandı. Hazırlanan bu uygulama dozları bekletilmeden içerisinde 0.5 gr hazır besiyeri olan steril cam deney tüplerine farklı deney grupları oluşturmak amacıyla her tüpe 2.5 mL olmak üzere gruplara özgü test solüsyonlarından eklendi. Mitomisin C ve çevresel kimyasal gruplarının yanı sıra sadece distile su kullanılan negatif kontrol grubu oluşturuldu

3.5. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinin Uygulanması

Çalışmada kullandığımız çevresel kirleticilerin olası genotoksik etkilerini kanat benek testi ile araştırmak amacıyla standart çapraz (ST) kuruldu. *mwh* erkekleri ile *flr*³ dişileri çaprazlanarak sekiz saat süreyle taze besiyerine yumurtlamaları sağlandı. Sekiz saatlik süre sonunda bireyler besiyerinden uzaklaştırılarak, yumurtalardan çıkan 72±4'lik larvalar (üçüncü evre larvaları) sayılarak gruplara özgü olarak hazırlanan cam tüplerdeki besiyerlerine transfer edildi. Böylece negatif kontrol, mitomisin C ve çevresel kimyasalların farklı dozlarının uygulama grupları eş zamanlı olarak oluşturuldu. Bu şekilde yeterli sayıdaki larvalar gruplara ayrıldı ve ergine gelişmeleri izlenerek, her uygulama grubu için yaşayabilirlik yüzdeleri ve genotoksik aktiviteleri kullanılan dozlara bağlı olarak araştırıldı. Yaşayabilirlik yüzdesi her grup için ayrı ayrı olmak üzere, larvadan ergine gelişebilen bireylerin oranı olarak hesaplandı.

3.5.1. Ergin Bireylerin Toplanarak, Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Uygulama ortamında test solüsyonlarına maruz bırakılan larvaların pupa evresini takiben çıkan ergin bireyler Bölüm 3.4.3’de anlatıldığı şekilde eterle bayıltılarak toplandı. Ergine gelişen transheterozigot (*mwh*+/*flr*3, normal kanatlı) ve testere dişi şeklinde kanat kenarlarına sahip bireyler arasından normal kanatlı bireyler seçildi. Bunlar arasında transheterozigot bireyler hem mutasyon ve hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonlara (beneklere) izin verirken, dengeleyici (balancer) heterozigot bireyler (*mwh*+/*TM3*, *BdS*) rekombinasyonun baskılanması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları (benekleri) içermektedir. Transheterozigot bireylerin kanatları kesilerek Faure çözeltisinin damlatıldığı lamalar üzerine yerleştirilmek suretiyle preparatlar hazırlandı (Rincon ve Graf, 1995). Kanat preparatlarının hazırlanmasında kullanılan Faure çözeltisinin içeriği Çizelge 3.3 de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Faure çözeltisi için gerekli malzemeler ve miktarları

Malzeme	Miktar
Gum Arabik	30 g
Gliserol	20 mL
Kloral hidrat	50 g
Distile Su	50 mL

Lam üzerine yeterince kanat çifti yerleştirildikten sonra preparatların kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletildi. Kuruyan preparatlardaki kanatların dorsal ve ventral yüzeyleri tekli beneklerin ve ikili beneklerin varlığını araştırmak amacıyla ışık mikroskobu altında 10 x 40 büyütme ile tarandı. Ardından beneklerin sayıları ve büyüklükleri kayıt edilerek, aşağıdaki gibi sınıflandırıldı;

- Küçük tekli benek (1-2 *mwh* veya *flr* hücre)
- Büyük tekli benek ($3 \leq mwh$ veya *flr* hücre grubu)
- İkili benek (*mwh* ve *flr* hücrelerin ikisini de içeren hücre grubu yan yana aynı benekte)

mwh benekler nokta mutasyon, delesyon ve *mwh* ve *flr* geni arasındaki rekombinasyon sonucu oluşmaktadır. *flr* benekler nokta mutasyon ve delesyon ile

oluşurken, ikili benekler ise flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen rekombinasyon ile ortaya çıkmaktadır (Rincon ve Graf, 1995).

3.5.2. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

Sonuçların istatistiksel analizi için benekler küçük tekli benekler, büyük tekli benekler ve ikili benekler olmak üzere üç gruba ayrılarak ayrı ayrı değerlendirildi. Genotoksik etkilerin değerlendirilmesi için deney gruplarının kanat başına düşen benek sayıları negatif kontrol grubu değerleri ile karşılaştırıldı.

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilirken orijinal (null) hipotez (H_0)’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez (H_a) de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezlerin Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplanmasıyla sonuçlar; pozitif (+), kısmen pozitif (z), belirsiz (i) ve negatif (-) olarak gösterildi (Frei ve Würger, 1988).

Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesine karar verilirken Kastenbaum ve Bowman çizelgesinden yararlanıldı (Kastenbaum ve Bowman, 1970). Hipotezlerin kurulması sırasında yapılan hesaplamalarda kullanılan parametreler aşağıda açıklamalarıyla birlikte gösterilmiştir (Doğan, 2008).

NC= Kontrol grubunda incelenen kanat sayısı

Nt= Uygulama grubunda incelenen kanat sayısı

nc= Kontrol grubunda gözlenen mutant klon sayısı

nt= uygulama grubunda gözlenen mutant klon sayısı

n= nt+nc= toplam mutant klonların sayısı

Po= Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, orijinal hipotez (H_0) için

$Po = nc / (NC + Nt)$

qo= Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Orijinal hipotez (H_0) için

$qo = Nt / (NC + Nt)$

PA= Kontrol grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez (H_a) için

$PA = nc / (NC + mNt)$

qA= Uygulama grubunda beklenen mutant klon frekansı, Alternatif hipotez (H_a) için

$qA = mNC + mNt$

Pon= Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez (H_0) için

qon= Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Orijinal hipotez (H_0) için

P_{An} = Kontrol grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez (H_a) için
 q_{An} = Uygulama grubunda beklenen mutant klon sayısı, Alternatif hipotez (H_a) için
 m = Çarpım sabiti

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için uygun olan bilgisayar programı Microsta ile öncelikle yukarıda verilen parametreler hesaplandı. Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (n_t) mutant klon sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 red edildi. Aynı şekilde kontrol grubundaki (n_c) mutant klon sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse (H_a) red edildi (Frei ve Würglers, 1988).

3.6. Çevresel Kimyasalların *ERR* Gen İfadesi Üzerine Etkilerini Belirlemeye Yönelik Çalışmalar

3.6.1. RNA Saflaştırılması için Larva Toplanması

Bölüm 3.5 de anlatıldığı gibi erkek *mwh* bireyleri ile bakire (virjin) *flr3* dişi bireyleri kullanılarak çaprazlamalar yapıldı. Besiyerine bırakılan döllenmiş yumurtalardan çıkan larvaların ikinci instar evresine erişmesi için 48 ± 4 saat beklendi ve besiyeri ortamı % 17 lik NaCl çözeltisi ile yıkanarak besiyerindeki larvaların ayrılması sağlandı. Larvaları içeren tuz çözeltisi kurutma kağıtlarının üzerine alındı ve larvalar zarar verilmeden sayılarak toplandı. Çalışmada kullanılacak olan çevresel kimyasalların dozları, genotoksisite çalışmalarından elde edilen bulgularımıza göre belirlenerek, Bölüm 3.4.4 de açıklandığı gibi hazırlandı. Toplanan larvalar içerisinde 0.5 g hazır besiyeri ve 2.5 ml test solüsyonu bulunan 2.5 cm X 7.5 cm ebatındaki cam tüplere aktarıldı. Çalışmalar en az 3 tekrarlı yapılarak, her bir tüpe ikinci instar evresinde olan 100 larva konuldu. Larvalar 24 saat süreyle bu besiyerinde tutuldu. 24 saatin sonunda besiyeri ortamı % 17 lik NaCl çözeltisi ile yıkanarak besiyerindeki larvaların ayrılması sağlandı. Larvaları içeren tuz çözeltisi kurutma kağıtlarının üzerine alındı ve larvalar zarar verilmeden sayılarak toplandı. Toplanan larvalar, içerisine 400 μ L “Lysis/Binding tampon” eklenen tüplere alınarak -80°C ’de derin dondurucuya kaldırıldı.

3.6.2. Toplam RNA Saflaştırılması

Deney sisteminde oluşturulan gruplarda, kit protokolüne uygun olarak 100 larvadan (yaklaşık 10 mg) toplam RNA saflaştırması için, High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) (Lot No:14289400) kullanıldı. Ekstraksiyondan önce -80°C ’de saklanan örnekler MagNA Lyser Instrument ile

homojenize edildi. Ekstraksiyon yapılacak numune sayısında 1.5 ml'lik ependorf tüpleri ayarlanarak tüplerin içerisine homojenize edilmiş numunelerin tüm miktarı alındı. Daha sonra numune miktarının yarısı kadar saf etanol tüplere ilave edilerek, vorteks cihazında karıştırıldı ve ependorfdaki tüm miktar daha öncesinde ayarladığımız toplama tüpü içindeki filtre ihtiva eden kolonların içine eklendi. 1 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolonun altındaki toplama tüpü dökülerek ve tekrar takılarak işleme devam edildi. 90 µl "Dnase inkübasyon tampon" ve 10 µl "Dnase I", numune sayısı kadar bir tüpte ayarlandı. Kolonların kapakları açılarak hazırladığımız Dnase çalışma tamponundan 100 µl ilave edilerek, 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyondan sonra tüplere 500 µl "yıkama tamponu I" ilave edilerek ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası kolonun altındaki toplama tüpü dökülerek, 500 µl "yıkama tamponu II" ilave edildi. 1 dakika 8000 rpm santrifüj sonrası kolonun altındaki toplama tüpü döküldü ve 300 µl "yıkama tamponu II" ilave edildi. 2 dakika 13000 rpm'de santrifüj sonrası kolonun altındaki toplama tüpü çöpe atılarak, kolon 1.5 ml'lik steril ependorf tüplerin içine konuldu. Tüm tüplere Elüsyon tamponundan 100 µl ilave edildi. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj sonrası ependorf içindeki kolon çöpe atıldı ve tüpün içerisinde RNA elde edildi. RNA miktarının belirlenmesi için Maestro RNA ölçüm cihazı kullanıldı ve RNA miktarı ng/µL cinsinden hesaplandı. Elde edilen RNA derin dondurucuda (-80 °C) cDNA sentezi için saklandı.

3.6.3. cDNA Sentez Protokolü

cDNA sentezi için "Transkriptor First Standart cDNA Synthesis Kit" (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) (Lot No: 14797225) kullanıldı. Kit protokolüne uygun olarak 1 µg total RNA, 1 µL Oligo dNTP (50pmol/µL), 1 µL Random Hexamer Primer (600pmol/µL) ve toplam hacim 13 µL olacak şekilde bidistile su 100 µL'lik PZR tüpüne konuldu. Bu PZR cihazına (ABI 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) yerleştirilerek 65°C'de 10 dk tutuldu. Daha sonra bu karışım üzerine 4 µL "Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer", 0,5 µL "Protector RNase Inhibitor", 2 µL Deoxynucleotide Mix (her nükleotid için 10 mM konsantrasyonda), 0,5 µL "Transcriptor Reverse Transcriptase" enzimi eklenerek 20 µL toplam hacim elde edildi. Karışım PZR cihazına yerleştirilerek cihaz 25°C'de 10 dk, 55 °C'de 60 dk ve 85 °C'de 5 dk olarak ayarlandı. Bu koşullarda sentezlenen cDNA -20 °C'de saklandı.

3.6.4. Gerçek Zamanlı PZR Protokolü

Gerçek Zamanlı PZR östrojen-ilişkili reseptör geni (*ERR*)'nin *A* (NM_168258.1) ve *B* (NM_139926.1) varyantları ile gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz 1 (*Gapdh1 A*) (NM_080369.2) geninin *A* varyantı için çalışıldı. Bu amaçla LightCycler TagMan Master kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) (Lot No: 14542322) ve *ERR A*, *ERR B* ve *Gapdh1* genlerine özgü olarak sentezlettirilen primerler (Integrated DNA Technologies, Munich, Almanya) ile probalar (Roche Applied Science, Universal probeLibrary) kullanıldı. Her bir gen için kapiler tüpe 4 µL TagMan prob, 0.2 µL prob (Universal ProbeLibrary) (son konsantrasyon 100 nM), her bir primerden 0.2 µL (100 nM) alındı ve toplam hacim su ile 15µL'ye tamamladı. Önceden hazırlanan cDNA'dan 5 µL eklenerek kapiler tüp kapatıldı. Bu şekilde hazırlanan örnekler gerçek zamanlı PZR cihazına (Roche Light Cycler 2.0) yerleştirildi. Cihaz ilk denetasyon için 95 °C'de 10 dakika, sonrasında 95 °C'de 10 saniye denetasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 saniye polarizasyon için 55 döngü olarak ayarlandı. Çizelge 3.4 de çalışma kapsamında olan genlere ait primer dizileri ve PZR sonucu oluşması beklenen ürün büyüklükleri verilmektedir. Her bir gen için *Gapdh1* genine göre gen ifadesi düzeyindeki rölatif farklılıkları belirlemek için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı (Livak ve Schmittgen, 2001).

Çizelge 3.4. *Gapdh1 A*, *ERR A* ve *ERR B* genlerine ait primer dizileri ve gerçek zamanlı PZR sonucu oluşması beklenen ürün büyüklükleri

Genler	Primer Dizileri (5'→3')	NCBI Gen Referans Numarası	Ürün Büyük- lüğü (bp)
<i>Gapdh1 A</i> - ileri	gaaaaagcggcagtcgtaat	NM_080369.2	91
<i>Gapdh1 A</i> -geri	aattccgatcttcgacatgg		
<i>ERR A</i> - ileri	cacaaaagatcctcagaacgatt	NM_168258.1	107
<i>ERR A</i> - geri	taaagcaggacgccgatg		
<i>ERR B</i> - ileri	agttctacgcgggagaagg	NM_139926.1	109
<i>ERR B</i> - geri	gagctgggactaaagcagga		

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada çevresel kirleticilerden Bisfenol A (BFA), Nonilfenol (NF), Tribütülin (TBT), Methidatyon (MD), 17- β östradiol (E2) ve Dietilstilbestrol (DES)'ün olası genotoksik etkileri *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında bu kimyasalların *D. melanogaster*'in östrojenle ilişkili reseptör (*ERR*) geni ifadesi üzerindeki etkileri de araştırılmıştır. Genotoksisite çalışmalarında Bölüm 3'de açıklanan deney sistemleri kurulmuştur. Çalışmalarda negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılırken, etanolde ve DMSO'da çözünen kimyasallar dikkate alınarak etanol ve DMSO grupları da çalışmalara eklenmiştir. Genotoksisite çalışmalarında, 72 ± 4 saatlik larvalardan ergine gelişen bireyler sayılarak her bir grup için hayatta kalış oranı hesaplanmış ve beneklerin varlığını araştırmak için trans-heterozigot bireylerin kanatları kesilerek ışık mikroskobu altında 400X büyütmeyle incelenmiştir. İncelemeler sırasında kanatlarda gözlenen benekler istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere tekli benekler (*mwh* veya *flr* fenotipinde) ve ikili benekler (*mwh* ve *flr* fenotipinde) olmak üzere sınıflandırılarak kaydedilmiştir. Ayrıca çalışmada tekli benekler kendi içerisinde küçük tekli benek (1-2 hücreli) ve büyük tekli benek ($3 \leq$ hücreli) olmak üzere ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Henderson, 2004).

4.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinden Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Mitomisin C'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Çalışmamızda ilk olarak Mitomisin C (MMC)'nin larvaların hayatta kalış oranı üzerine etkisi ile genotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla MMC'nin 0.025 mM, 0.05mM ve 0.1 mM konsantrasyonları için gruplar oluşturulmuş ve bu gruplardan elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. MMC gruplarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

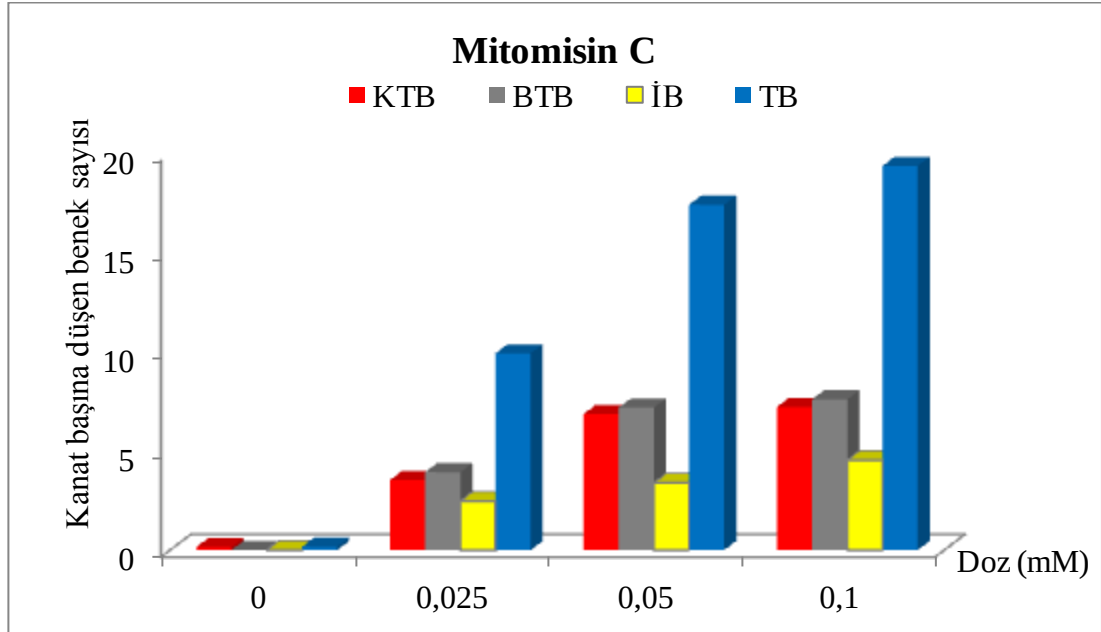
Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	97	224	0.16 (35)	0.01 (4)	0.00 (0)	0.17 (39)
MMC (mM)						
0,025	62	85	3.53(300) +	3.93(334) +	2.47(210) +	9.93(844) +
0,05	58	70	6.86(480) +	7.19(503) +	3.39(237) +	17.43(1220) +
0,1	45	70	7.23(506) +	7.61(533) +	4.54(318) +	19.39(1357) +

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würzler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, tüm MMC gruplarında larvaların hayatta kalış oranlarının doz artışına paralel olarak azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubu olan distile su grubunda hayatta kalış oranı %97 iken, 0.025, 0.05 ve 0.1 mM MMC gruplarında sırasıyla % 62, % 58 ve % 45 olarak bulunmuştur.

Diğer taraftan MMC'nin kontrol grubuna kıyasla, doz artışına paralel olarak tüm benek tiplerini önemli ölçüde arttırdığı Şekil 4.1 de görülmektedir.



Şekil 4.1. Mitomisin C (MMC) uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek ve büyük tekli benek sıklıkları sırasıyla 0.16, 0.01 iken, ikili beneğe rastlanmamıştır. En küçük MMC dozunda (0.025 mM) küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikili benek sıklıkları sırasıyla 3.53, 3.93 ve 2.47 olarak bulunmuştur. Benek sıklıklarında MMC'nin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak artış gözlenmiştir (Şekil 4.1).

4.1.2. Çevresel Kimyasalların Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Çalışmamızın bu bölümünde çevresel kimyasallardan olan BFA, NF, TBT, MD, E2 ve DES'in genotoksik etkileri *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan dozlar literatür taraması sonucu, yapılan ön çalışmalarla belirlenmiştir. Çalışmamızda kullandığımız kimyasallar suda tam olarak çözünmediği için, BFA, NF, TBT, DES ve E2'yi çözmek amacıyla etanol, MD'yi çözmek için ise DMSO kullanılmış ve çalışma gruplarımıza etanol ve DMSO grupları da eklenmiştir.

4.1.2.1. Etanol'ün Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Çevresel kimyasallardan BFA, NF, TBT, DES ve E2'nin uygulama gruplarını hazırlamak için, öncelikli olarak söz konusu kimyasalların %99 oranında saflık derecesine sahip olan etanolde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Uygulama grupları hazırlanırken, stok çözeltilerden hesaplanan miktarlarda çözelti alınarak, istenilen konsantrasyonlara ulaşmak amacıyla distile su eklenmiştir. Çalışmalar sırasında kullanılan en yüksek etanol konsantrasyonu olan % 5'lik etanol çözeltisinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Çizelge 4.2 de verilmektedir.

Çizelge 4.2. Etanol grubunda *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Distile su	97	224	0.16 (35)	0.01 (4)	0.00 (0)	0.17 (39)
Etanol (% 5)	93	92	0.16 (15) i	0.02 (2) i	-	0.18 (17) i

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würger (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 97 iken, etanol grubunda % 93 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda ve etanol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16 olarak bulunmasına rağmen, kontrol grubunda büyük tekli benek sıklığı 0.01, etanol grubunda ise 0.02 olarak bulunmuştur. Ayrıca kontrol grubunda toplam benek sıklığı 0.17 olarak bulunmuşken, etanol grubunda ise toplam benek sıklığı ise 0.18 olarak bulunmuştur. Hem kontrol grubunda hem de etanol grubunda ikili benek gözlenmemiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda kontrol ve etanol grubu arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bu bağlamda, etanol uygulamasının, *Drosophila*’da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı söylenebilir.

4.1.2.2. DMSO’nun Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Çevresel kimyasallardan olan MD’nin uygulama gruplarını hazırlamak için öncelikli olarak söz konusu kimyasalın %99 oranında saflık derecesine sahip olan DMSO’da stok çözeltisi hazırlanmıştır. Uygulama grupları hazırlanırken, stok çözeltiden hesaplanan miktarlarda çözelti alınarak, istenilen konsantrasyonlara ulaşmak amacıyla distile su eklenmiştir. Çalışma sırasında kullanılan en yüksek DMSO konsantrasyonu olan % 0.5’lik DMSO çözeltisinin genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular Çizelge 4.3 de verilmektedir.

Çizelge 4.3. DMSO grubunda *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Distile su	97	224	0.16 (35)	0.01 (4)	0.00 (0)	0.17 (39)
DMSO (% 0,5)	95	110	0.14(16) i	0.009(1) i	0.00(0)	0.15(17) i

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würger (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Kontrol grubunda hayatta kalış oranı % 97 iken, DMSO grubunda % 95 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16, büyük tekli benek sıklığı 0.01 ve toplam benek sıklığı 0.17 olarak bulunmuştur. DMSO grubunda

ise küçük tekli benek sıklığı 0.14, büyük tekli benek sıklığı 0.009, toplam benek sıklığı ise 0.15 olarak bulunmuştur. Hem kontrol grubunda, hem de DMSO grubunda ikili benek gözlenmemiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol ve DMSO grubu arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Bu bağlamda, DMSO uygulamasının, *Drosophila*’da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı söylenebilir.

4.1.2.3. BFA’nın Genotoksik Etkisinin Araştırılması

BFA’nın genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 0.02 mg/L ile 500 mg/L arasında değişen sekiz farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.4 de verilmiştir.

Çizelge 4.4. BFA dozlarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*	İstatistiksel Bulgular**		
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	96	100	0.09 (9)	0.03 (3)	-	0.12 (12)
BFA (mg/L)						
0.02	94	110	0.09 (10) i	0.03 (3) i	-	0.12 (13) i
0.1	96	100	0.08 (8) i	0.03 (3) i	-	0.11 (11) i
0.5	95	100	0.09 (9) i	0.04 (4) i	0.01 (1) i	0.14 (14) i
2.5	94	90	0.08 (7) i	0.03 (3) i	0.01 (1) i	0.12 (11) i
12.5	95	90	0.10 (9) i	0.03 (3) i	0.01 (1) i	0.14 (13) i
62.5	92	90	0.16 (14) i	0.02 (2) i	-	0.18 (16) i
100	89	90	0.13 (12) i	0.02 (2) i	-	0.16 (14) i
500	92	92	0.15 (14) i	0.02 (2) i	-	0.17 (16) i

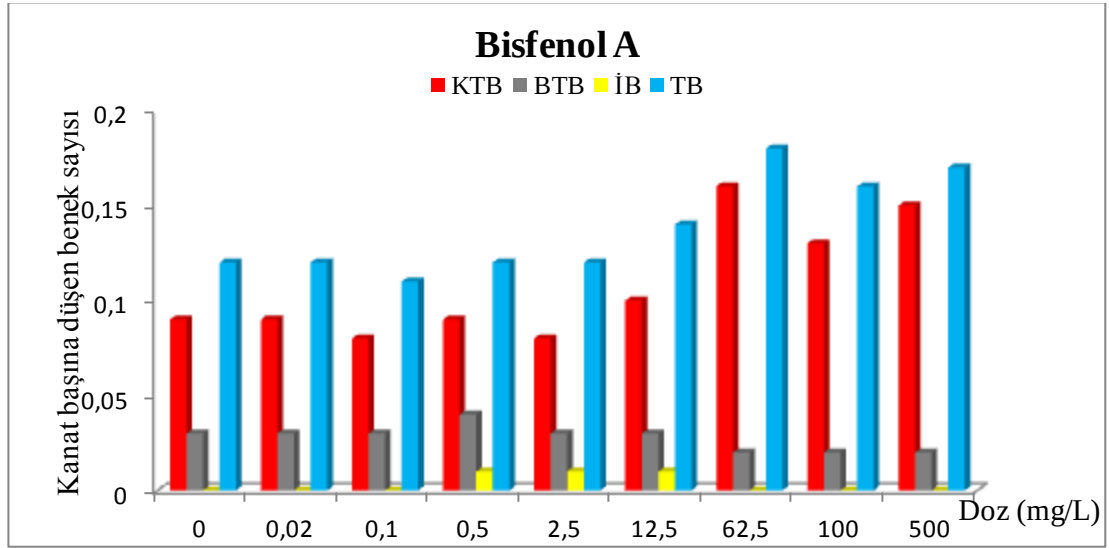
*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würger (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 96 iken, BFA’nın en düşük (0.02 mg/L) dozunda ve en yüksek (500 mg/L) dozunda sırasıyla % 94 ve % 92 olarak bulunmuştur.

Bu bağlamda, kontrol grubu ile tüm BFA konsantrasyonları arasında hayatta kalış oranı bakımından önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Dolayısıyla BFA’nın uygulanan dozlarının *Drosophila*’da toksik etkiye neden olmadığı saptanmıştır.

Tüm BFA dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.2 de görülmektedir.



Şekil 4.2. BFA uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.09, toplam benek sıklığı ise 0.12 olarak bulunmuşken, en yüksek BFA dozunda (500 mg/L) küçük tekli benek sıklığı 0.15, toplam benek sıklığı 0.17 olarak bulunmuştur. Buna göre en yüksek BFA dozunun uygulandığı grupta gözlenen küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı, kontrol grubunda gözlenen benek sıklıklarından daha fazla bulunmasına rağmen, istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık elde edilememiştir. Ayrıca kontrol grubunda hiç ikili benek gözlenmezken, 0.5 mg/L, 2.5 mg/L ve 12.5 mg/L BFA gruplarında ikili benek gözlenmiş, ancak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda anlamlı bulunmamıştır.

4.1.2.4. NF'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

NF'nin genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 0.02 mg/L ile 500 mg/L arasında değişen sekiz farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.5 de verilmiştir.

Çizelge 4.5. NF dozlarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	96	100	0.09 (9)	0.03 (3)	-	0.12 (12)
NF (mg/L)						
0.02	95	90	0.08 (7) i	0.04 (4) i	-	0.12 (11) i
0.1	96	90	0.08 (7) i	0.03 (3) i	0.01 (1) i	0.12 (11) i
0.5	95	100	0.08 (8) i	0.02 (2) i	-	0.10 (10) i
2.5	96	90	0.09 (8) i	0.03 (3) i	-	0.12 (11) i
12.5	95	87	0.07 (8) i	0.02 (2) i	0.02 (2) i	0.14 (12) i
62.5	93	92	0.14 (13) i	0.03 (3) i	-	0.17 (16) i
100	94	95	0.15 (14) i	0.02 (2) i	-	0.17 (16) i
500	92	94	0.15 (14) i	0.03 (3) i	-	0.18 (17) i

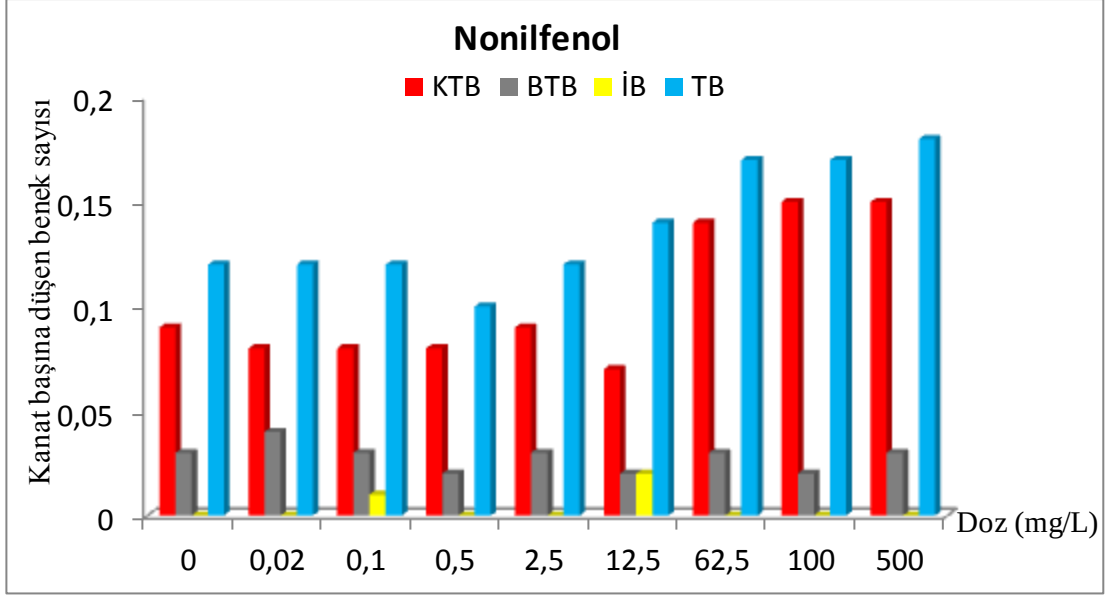
*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würgler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 96 iken, NF'nin en düşük dozunda (0.02 mg/L) ve en yüksek dozunda (500 mg/L) sırasıyla % 95 ve % 92 olarak bulunmuştur.

Bu bağlamda, kontrol grubu ile tüm NF konsantrasyonları arasında hayatta kalış oranı bakımından önemli bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Dolayısıyla NF'nin uygulanan dozlarının *Drosophila*'da toksik etkiye neden olmadığı saptanmıştır.

Tüm NF dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.3 de görülmektedir.



Şekil 4.3. NF uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.09, toplam benek sıklığı ise 0.12 olarak bulunmuşken, en yüksek NF dozunda (500 mg/L) küçük tekli benek sıklığı 0.15, toplam benek sıklığı 0.18 olarak bulunmuştur. Buna göre en yüksek NF dozunun uygulandığı grupta gözlenen küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı, kontrol grubunda gözlenen benek sıklıklarından daha fazla bulunmasına rağmen, istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık elde edilememiştir. Ayrıca kontrol grubunda hiç ikili benek gözlenmezken, NF'nin 0.1 mg/L ve 12.5 mg/L dozlarında ikili benek gözlenmiş ancak istatistiksel değerlendirmede anlamlı bulunmamıştır.

4.1.2.5. DES'in Genotoksik Etkisinin Araştırılması

DES'in genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 1 mM ile 8 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.6 da verilmiştir.

Çizelge 4.6. DES dozlarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

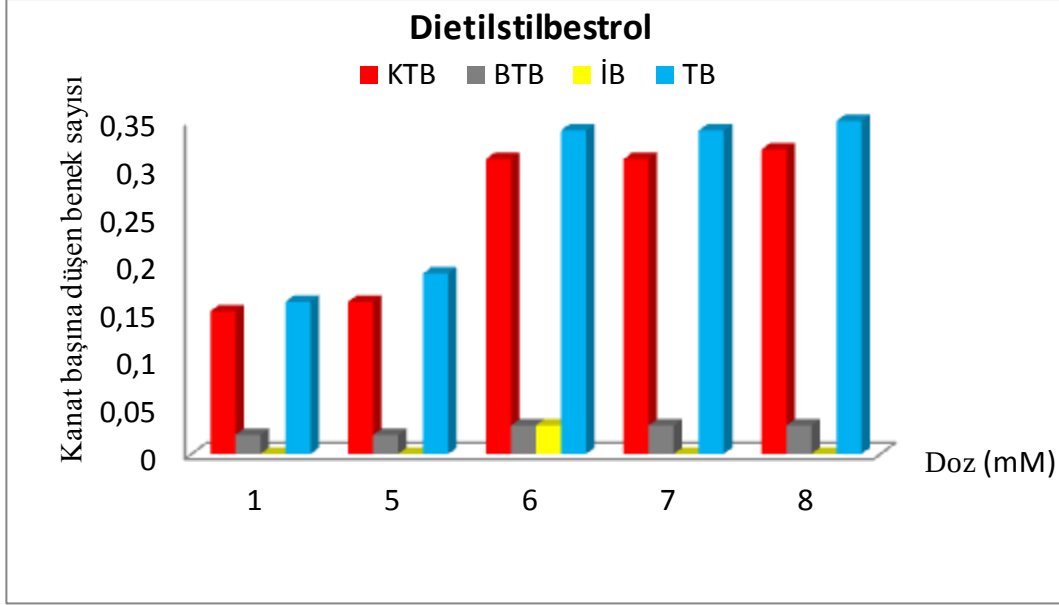
Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	96	100	0.16 (16)	0.03 (3)	-	0.19 (19)
DES (mM)						
1	85	55	0.15 (8) i	0.02 (1) i	-	0.16 (9) i
5	75	43	0.16 (7) i	0.02 (1) i	-	0.19 (8) i
6	55	29	0.31 (9) i	0.03 (1) i	0.03 (1) i	0.34 (10) i
7	39	32	0.31 (10) i	0.03 (1) i	-	0.34 (11) i
8	27	34	0.32 (11) i	0.02 (1) i	-	0.35 (12) i

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würgler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 96 iken, DES'in en düşük dozunda (1 mM) ve en yüksek dozunda (8 mM) sırasıyla % 85 ve % 27 olarak bulunmuştur. DES'in uygulanan dozlarının, hayatta kalış oranının doz artışına paralel olarak azalttığı gözlenmiştir. Larvaların hayatta kalış oranı DES'in en yüksek dozunda (8 mM) oldukça azalmıştır (Çizelge 4.6). Dolayısıyla uygulanan DES dozları *Drosophila*'da toksik etkiye neden olmaktadır.

Tüm DES dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.4 de görülmektedir.



Şekil 4.4. Dietilstilbestrol uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16, büyük tekli benek sıklığı 0.03, toplam benek sıklığı ise 0.19 olarak bulunmuşken, en yüksek DES dozunda (8 mM) küçük tekli benek sıklığı 0.32, büyük tekli benek sıklığı 0.02, toplam benek sıklığı ise 0.35 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda en yüksek DES dozunun (8 mM) uygulandığı grupta gözlenen küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı, kontrol grubunda gözlenen benek sıklıklarından daha fazla bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık elde edilememiştir.

4.1.2.6. E2'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

E2'nin genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 1 mM ile 10 mM arasında değişen beş farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.7 de verilmiştir.

Çizelge 4.7. E2 dozlarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

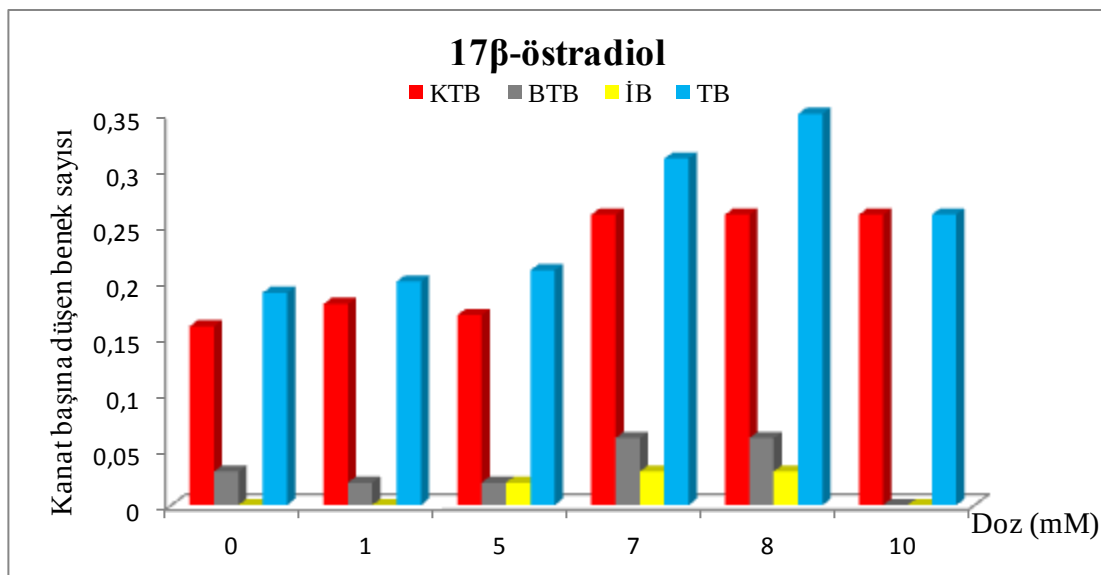
Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	96	100	0.16 (16)	0.03 (3)	-	0.19 (19)
E2 (mM)						
1	90	50	0.18 (9) i	0.02 (1) i	-	0.20 (10) i
5	75	47	0.17 (8) i	0.02 (1) i	0.02 (1) i	0.21 (10) i
7	70	35	0.26 (9) i	0.06 (1) i	0.03 (1) i	0.31 (11) i
8	64	34	0.26 (9) i	0.06 (2) i	0.03 (1) i	0.35 (12) i
10	25	27	0.26 (7) i	-	-	0.26 (7) i

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würger (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 96 iken, E2'nin en düşük (1 mM) dozunda ve en yüksek (10 mM) dozunda sırasıyla % 90 ve % 25 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda E2'nin hayatta kalış oranını doz artışına paralel olarak azalttığı gözlenmiştir. Larvaların hayatta kalış oranı E2'nin en yüksek dozunun uygulandığı grupta (10 mM) oldukça azalmıştır (Çizelge 4.6). Dolayısıyla E2'nin *Drosophila*'da toksik etkiye neden olduğu saptanmıştır.

Tüm E2 dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.5 de görülmektedir.



Şekil 4.5. 17β-östradiol uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16, toplam benek sıklığı ise 0.19 olarak bulunmuşken, en yüksek E2 dozunda (10 mM) küçük tekli benek sıklığı ve toplam benek sıklığı 0.26 olarak bulunmuştur. Tüm E2 gruplarında gözlenen küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı, kontrol grubunda gözlenen benek sıklıklarından daha fazla bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık elde edilememiştir. Ayrıca kontrol grubunda hiç ikili benek gözlenmezken, E2'nin 5 mM, 7 mM ve 8 mM dozlarında ikili benek gözlenmiş ama istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır.

4.1.2.7. TBT'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

TBT'nin genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 0.1 ile 50 mg/L arasında değişen beş farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. TBT uygulanan gruplardan elde edilen sonuçlar ve distile su kontrol grubuna göre yapılan istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.8 de verilmiştir.

Çizelge 4.8. TBT dozlarında *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

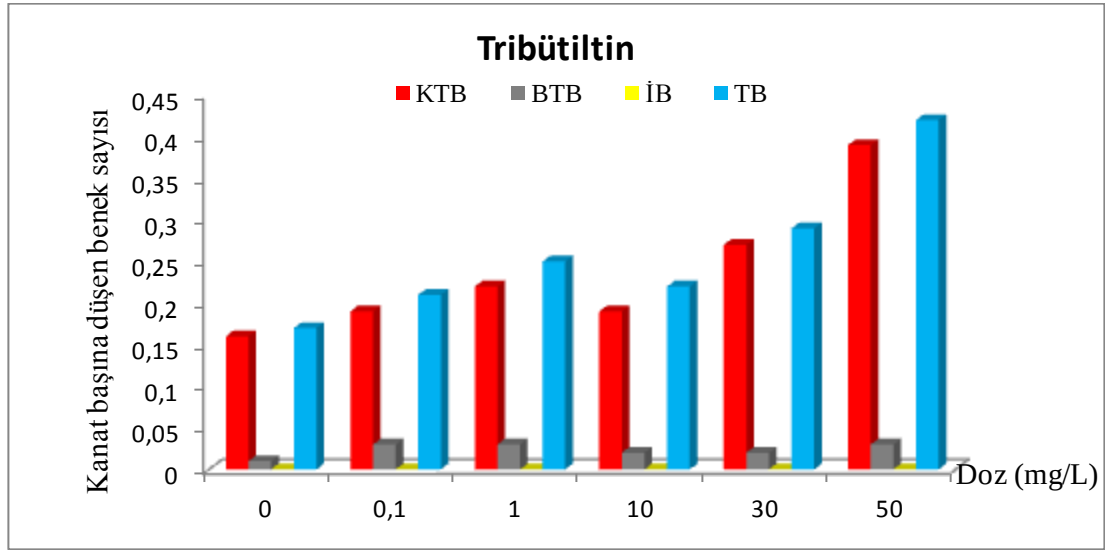
			Benek/Kanat*	İstatistiksel Bulgular**		
Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	97	224	0.16 (35)	0.01 (4)	0.00 (0)	0.17 (39)
TBT (mg/L)						
0,1	87	70	0.19 (13) i	0.03 (2) i	0.00(0) i	0.21 (15) i
1	86	65	0.22 (14) i	0.03 (2) i	0.00(0) i	0.25 (16) i
10	75	83	0.19 (16) i	0.02 (2) i	0.00(0) i	0.22 (18) i
30	34	45	0.27 (12) i	0.02 (1) i	0.00(0) i	0.29 (13) i
50	30	38	0.39 (15) +	0.03 (1) i	0.00(0) i	0.42 (16) +

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würzler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 97 iken, TBT'nin en düşük dozunda (0,1 mg/L) ve en yüksek dozunda (50 mg/L) sırasıyla % 87 ve % 30 olarak bulunmuş ve doz artışına bağlı olarak hayatta kalış oranının azaldığı gözlenmiştir. Dolayısıyla uygulanan TBT dozları *Drosophila*'da toksik etkiye neden olmaktadır.

Tüm TBT dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.6 da görülmektedir.



Şekil 4.6. Tribütülin uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16, büyük tekli benek sıklığı 0.01, toplam benek sıklığı ise 0.17 olarak bulunmuşken, en yüksek TBT dozunda (50 mg/L) küçük tekli benek sıklığı 0.39, büyük tekli benek sıklığı 0.03, toplam benek sıklığı ise 0.42 olarak bulunmuştur. Tüm TBT dozlarında küçük tekli benek, büyük tekli benek ve toplam benek sıklığının, kontrol grubundan daha fazla bulunduğu ancak, ikili benek sıklığının değişmediği gözlenmiştir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, en yüksek TBT dozunda (50 mg/L) küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı bakımından pozitif sonuçlar elde edilmesine karşın, büyük tekli benek ve ikili benek sıklığı bakımından kontrol grubu ile istatistiksel olarak belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Kontrol grubu ve diğer TBT dozları arasında ise tüm benek sıklıkları bakımından önemli bir farklılık bulunmamıştır.

4.1.2.8. MD'nin Genotoksik Etkisinin Araştırılması

Methidatyon'un genotoksik etkisini araştırmak amacıyla 0,01 mg/L ile 0,075 mg/L arasında değişen beş farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu. Elde edilen sonuçlar ve istatistiksel değerlendirmeler Çizelge 4.9 da verilmiştir.

Çizelge 4.9. MD dozlarından elde edilen *Drosophila* kanat benek testi bulguları ve istatistik değerlendirmeler

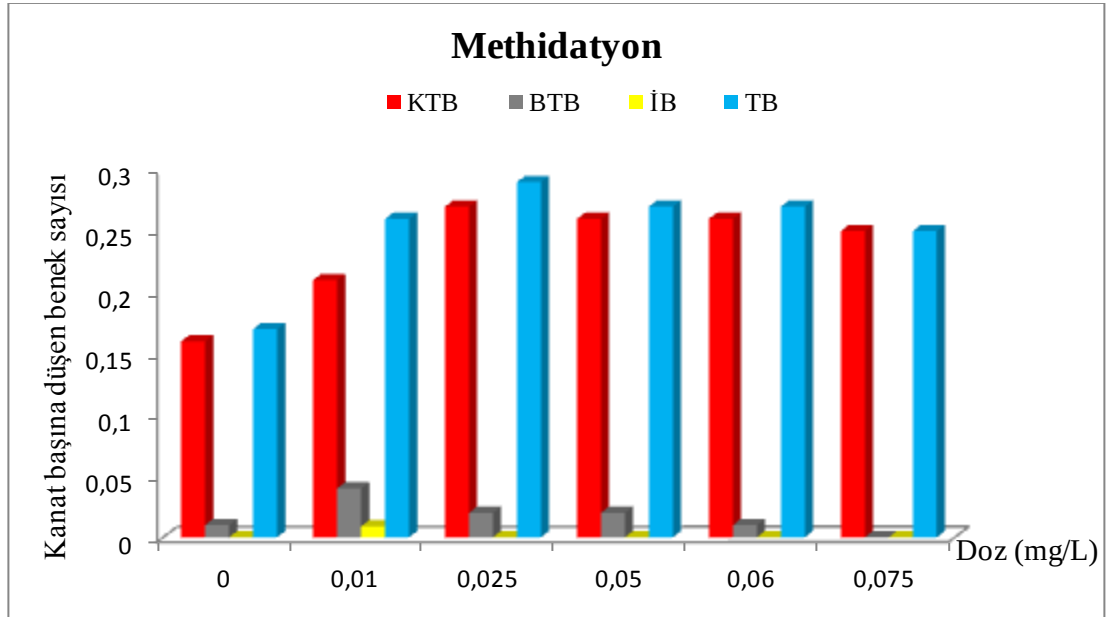
Uygulama grupları	Hayatta kalış %	Kanat sayısı	Benek/Kanat*		İstatistiksel Bulgular**	
			Küçük tekli benekler (1-2 hücre) (m=2)	Büyük tekli benekler (>2 hücre) (m=5)	İkili benekler (m=5)	Toplam benek sayısı (m=2)
Kontrol						
0	97	224	0.16 (35)	0.01 (4)	0.00 (0)	0.17 (39)
MD (mg/L)						
0,01	90	108	0.21(23) i	0.04(4) i	0.009(1) i	0.26(28) i
0,025	93	104	0.27(28) i	0.02(2) i	0.00(0) i	0.29 (30) i
0,05	88	87	0.25(22) i	0.02(2) i	0.00(0) i	0.27 (24) i
0,06	86	70	0.26 (18) i	0.01(1) i	0.00(0) i	0.27 (19) i
0,075	36	60	0.25 (15) i	0.00(0) i	0.00(0) i	0.25 (15) i

*Kanat başına düşen benek sayısı, (Parantez içinde verilenler benek sayılarıdır.)

**Tek yönlü Kastenbaum-Bowman Testi, Frei ve Würgler (1988), +: pozitif, -: negatif, i: yetersiz, m: çok değişkenli faktör, olasılık seviyeleri: $\alpha=\beta=0.05$

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda larvaların hayatta kalış oranı % 97 iken, MD'nin en düşük dozunda (0,01 mg/L) ve en yüksek dozunda (0,075 mg/L) sırasıyla % 90 ve % 36 olarak bulunmuştur. Bu bağlamda MD'nin doz artışına paralel olarak hayatta kalış oranını azalttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla MD *Drosophila*'da toksik etkiye neden olmaktadır.

Tüm MD dozlarında gözlenen benek sıklıklarının kontrol grubu ile karşılaştırılması Şekil 4.7 de görülmektedir.



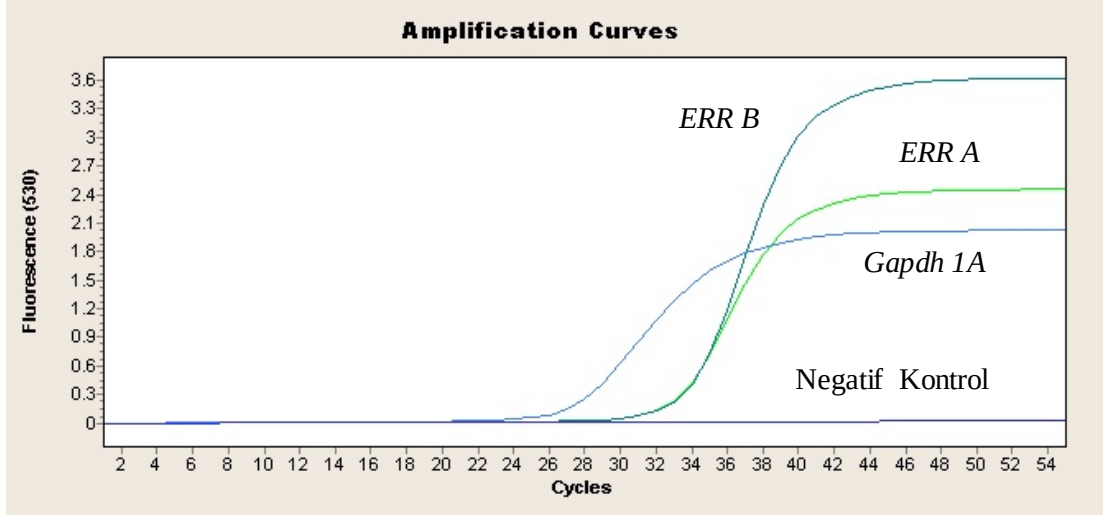
Şekil 4.7. Methidatyon uygulaması sonucunda kanat başına düşen benek sayılarının doza bağlı olarak karşılaştırılması, KTB; küçük tekli benek, BTB; büyük tekli benek, İB; ikili benek, TB; toplam benek, 0; distile su.

Elde edilen bulgulara göre, kontrol grubunda küçük tekli benek sıklığı 0.16, büyük tekli benek sıklığı 0.01, toplam benek sıklığı ise 0.17 olarak bulunmuşken, en yüksek MD dozunda (0,075mg/L) küçük tekli benek sıklığı ve toplam benek sıklığı ise 0.25 olarak bulunmuştur. Tüm MD gruplarında gözlenen küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı kontrol grubunda gözlenen benek sıklıklarından daha fazla bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan belirgin bir farklılık elde edilememiştir.

4.2. Çevresel Kimyasalların *ERR* Gen İfadesi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Çalışmaların bu bölümünde Bölüm 3.4.4 de açıklandığı gibi çevresel kimyasalların belirlenen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca etanol ve DMSO'da çözünen kimyasallar dikkate alınarak, etanol ve DMSO grupları da çalışmalara eklenmiştir. Hazırlanan çözeltiler *Drosophila* hazır besiyerine eklenerek çalışma grupları oluşturulmuştur. Çalışmalar en az 3 tekrarlı yapılmıştır. Bu çözeltilerin bulunduğu besiyerlerine yapılan çaprazdan elde edilen ikinci instar evresindeki larvalar (48 ± 4 saat) konularak, 24 saat süreyle bu besiyerinde kalmaları sağlanmıştır. 24 saatlik beslenme sürecinden sonra, üçüncü instar evresinde olan larvalar (72 ± 4 saat) besiyerinden uzaklaştırılarak *ERR* gen ifadesinin belirlenmesine yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C 'ye kaldırılmıştır.

Her örnekten saflaştırılan RNA'lar kullanılarak elde edilen cDNA'lar kullanılarak *Gapdh1 A*, *ERR A* ve *ERR B* genlerine özgü primerler kullanılarak gerçek zamanlı PZR'a alınmıştır (Şekil 4.8). Gerçek zamanlı PZR sonrası elde edilen ürünler agaroz jele yüklenerek primer bağlanmasının özgüllüğü ve beklenen ürünlerin varlığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesinin gerçek zamanlı PZR analizi. *Gapdh 1 A*, *ERR A* ve *ERR B* mRNA'larından sentezlenen cDNA'ların gerçek zamanlı PZR sonucu oluşan eğrileri.



Şekil 4.9. *ERR A* (1,2,3 ve 4)(107 bp), *ERR B* (5,6,7 ve 8) (109 bp) ve *Gapdh1 A* (9,10,11 ve 12) (91 bp) cDNA'larının PZR sonucu oluşan ürünlerinin agaroz jel (%2) elektroforezi görüntüsü. DNA markeri (M) 100 bp dir.

Etanol, DMSO ve çevresel kimyasalların farklı konsantrasyonları ile bu konsantrasyonların *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadeleri üzerine etkisine ait tüm bulgular Çizelge 4.10 da verilmiştir. Buna göre tüm gruplarda *ERR A* ve *ERR B* genleri için elde edilen değerler Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılığın anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Daha sonra gruplar arası fark Conover Testi ile analiz edildi.

Çizelge 4.10. BFA, NF, DES, E2, TBT ve MD'nin *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadesi üzerine göreceli etkisi

Gruplar	Konsantrasyonlar	<i>ERR A</i>		<i>ERR B</i>
Kontrol		3.142 ±	0.978	1.394 ± 0.109
Etanol (%5)		1.870 ±	1.206	1.210 ± 0.256
DMSO (%0.05)		8.207 ±	0.393 * ↑	2.447 ± 0.325
BFA(mg/L)	0.5	2.107 ±	1.262	0.793 ± 0.415
	12.5	13.592 ±	3.016 * ↑	3.530 ± 0.311 * ↑
	100	25.986 ±	10.882 * ↑	9.960 ± 4.907 * ↑
NF(mg/L)	0.5	19.307 ±	11.520 * ↑	4.627 ± 2.656
	12.5	13.600 ±	2.940 * ↑	5.600 ± 3.395
	100	4.880 ±	1.009	3.370 ± 1.095
DES (mM)	1	1.790 ±	0.746	3.035 ± 0.600
	5	1.295 ±	0.432	4.555 ± 0.899 * ↑
	8	4.720 ±	1.758	4.510 ± 0.858 * ↑
E2 (mM)	1	2.260 ±	0.607	1.163 ± 0.262
	5	2.110 ±	0.460	1.185 ± 0.226
	10	3.052 ±	1.110	1.227 ± 0.455
TBT (mg/L)	1	0.547 ±	0.260 * ↓	0.177 ± 0.112
	10	2.990 ±	2.130	0.917 ± 0.322
	50	0.850 ±	0.443	2.026 ± 0.375
MD (mg/L)	0.01	49.530 ±	34.503 *	7.183 ± 3.284 * ↑
	0.05	1.230 ±	0.370 ** ↓	3.350 ± 1.943
	0.075	2.403 ±	1.413 ** ↓	9.913 ± 4.003 * ↑

ERR A ve *ERR B* değeri ortalama±standart hata cinsinden ifade edilmiştir.

* Kontrol ile karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

** MD DMSO'da çözüldüğünden, DMSO ile karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

↑ İstatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir (p<0.05).

↓ İstatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğunu göstermektedir (p<0.05).

Çalışmada BFA, NF, DES, E2 ve TBT çözeltileri hazırlanırken kullandığımız etanol, distile su ile karşılaştırılmış ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). MD çözeltileri hazırlanırken kullandığımız DMSO'nun distile su ile karşılaştırılması sonucunda ise *ERR A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir (p<0.05). *ERR B* gen ifadesinde ise anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlenmiştir (p>0.05). Çalışmamızda DMSO'nun distile su ile kıyaslandığında *ERR A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Distile su grubunda 3.142 ± 0.978 olarak bulunan *ERR A* gen ifade değeri DMSO grubunda 8.207 ± 0.393 olarak bulunmuştur.

Çalışmada BFA'nın *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 0.5 mg/L, 12.5 mg/L, 100 mg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen bulgulara göre, BFA'nın 12.5 mg/L ve 100 mg/L dozlarından elde edilen sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem *ERR A* hem de *ERR B* gen ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu belirlendi ($p < 0.05$). BFA'nın 0.5 mg/L dozunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$). Bu bağlamda kontrol grubunda *ERR A* ve *ERR B* gen ifade değerleri sırasıyla 3.142 ± 0.978 ve 1.394 ± 0.109 olarak saptanmışken, BFA'nın 12.5 mg/L dozunda 13.592 ± 3.016 ve 3.530 ± 0.311 olarak gözlemlenmiştir. 100 mg/L'lik BFA dozunda ise *ERR A* ve *ERR B* gen ifade değerleri sırasıyla 25.986 ± 10.882 ve 9.960 ± 4.907 olarak bulunmuştur.

Çalışma kapsamında NF'nin *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 0.5 mg/L, 12.5 mg/L, 100 mg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen bulgulara göre, NF'nin 0.5 mg/L ve 12.5 mg/L dozlarının *ERR A* gen ifadesini arttırdığı ve bu artışın anlamlı olduğu bulunurken, NF'nin 100 mg/L dozunun *ERR A* gen ifadesini etkilemediği saptanmıştır ($p > 0.05$). Bu bağlamda kontrol grubunda *ERR A* gen ifade değeri 3.142 ± 0.978 olarak saptanmışken, NF'nin 0.5 mg/L ve 12.5 mg/L dozunda sırasıyla 19.307 ± 11.520 ve 13.600 ± 2.940 olarak bulunmuştur.

ERR B geninin ifade değerleri incelendiğinde ise, tüm NF konsantrasyonlarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık olmadığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir ($p > 0.05$).

Çalışmada DES'in *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 1 mM, 5mM ve 8 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen bulgulara göre, DES'in hiçbir dozunun kontrol grubuna kıyasla *ERR A* gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlemlenmiştir ($p > 0.05$).

ERR B gen ifade değerleri incelendiğinde, DES'in 5 mM ve 8 mM dozlarında kontrol grubuna kıyasla farklılık olduğu bulunurken, 1 mM dozunda ise farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Bu bağlamda kontrol grubunda *ERR B* gen ifade değeri 1.394 ± 0.109 olarak bulunmuşken, DES'in 5 mM ve 8 mM dozlarında sırasıyla 4.555 ± 0.899 ve 4.510 ± 0.858 olarak gözlemlenmiştir.

Çalışmada E2'nin *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadeleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 1 mM, 5mM ve 10 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen bulgulara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında E2'nin hiçbir dozunda, *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$).

Çalışmada TBT'nin *ERRA* ve *ERRB* genlerinin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 1 mg/L, 10 mg/L ve 50 mg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

Elde edilen bulgulara göre TBT'nin 1 mg/L dozunda *ERR A* gen ifadesi kontrol grubuna kıyasla azalmıştır ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Diğer TBT dozlarının (10 mg/L ve 50 mg/L) ise *ERR A* geninin ifadesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirmedığı belirlenmiştir. Bu anlamda kontrol grubunda *ERR A* gen ifade değeri 3.142 ± 0.978 olarak saptanmışken TBT'nin 1 mg/L dozunda 0.547 ± 0.260 olarak bulunmuştur.

ERR B gen ifade değerleri incelendiğinde ise, TBT'nin hiçbir dozunun gen ifadesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).

Çalışmada MD'nin *ERR A* ve *ERR B* genlerinin ifadesi üzerine etkisini araştırmak amacıyla, 0.01 mg/L, 0.05 mg/L ve 0075 mg/L olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulama grupları oluşturuldu.

MD çözeltisi hazırlanırken DMSO kullanıldığından DMSO grubu da çalışmalara eklenmiştir. DMSO ve kontrol grubu *ERR A* gen ifadesi bakımından karşılaştırıldığında farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Bu nedenle MD dozlarının *ERR A* gen ifadesi üzerine etkisi istatistiksel olarak hem kontrol grubu hem de DMSO grubuna göre değerlendirilmiştir.

Tüm MD dozlarının kontrol grubu ile karşılaştırılmasından elde edilen bulgulara göre, sadece 0.01 mg/L MD dozu *ERR A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olarak, gen ifadesini arttırmıştır ($p<0.05$). Buna göre kontrol grubunda *ERR A* gen ifade değeri 3.142 ± 0.978 olarak saptanırken, 0.01 mg/L MD dozunda 49.530 ± 34.503 olarak belirlenmiştir.

ERR B gen ifade değerleri incelendiğinde ise, sadece 0.01 mg/L ve 0.075 mg/L dozlarının gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olarak, gen ifadesini arttırdığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubunda 1.394 ± 0.109 olarak

belirlenen *ERR B* gen ifade değeri, MD'nin 0.01 mg/L ve 0.075 mg/L dozlarında sırasıyla 7.183 ± 3.284 ve 9.913 ± 4.003 olarak belirlenmiştir.

Tüm MD gruplarının DMSO ile karşılaştırılmasından elde edilen bulgulara göre, sadece 0.05 mg/L ve 0.075 mg/L MD dozu *ERRA* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olarak, gen ifadesini azaltmıştır ($p < 0.05$). DMSO grubunda *ERR A* gen ifade değeri 8.207 ± 0.393 olarak gözlenmişken, 0.05 mg/L ve 0.075 mg/L MD dozlarında sırasıyla 1.230 ± 0.370 ve 2.403 ± 1.413 olarak belirlenmiştir.

ERR B gen ifade değerleri incelendiğinde ise MD'nin hiçbir dozunun, gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çeşitli faaliyetler sonucu doğada bulunan ve organizmaya değişik yollarla girerek birçok olumsuz etkiye neden olan çevresel kimyasalların, farklı test sistemlerinin kullanılarak olası toksik ve genotoksik etkilerinin rapor edildiği birçok çalışma bulunmaktadır. (Benachour ve Aris, 2009; Diaz vd., 2014; Lee vd., 2013; Güngördü, 2013; Silva vd., 2014). Özellikle son on yılda, çevresel kimyasallara maruziyetle ilgili olası riskleri ele alan epidemiyolojik çalışmaların sayısında büyük bir artış vardır (Kalkbrenner vd., 2014). Bir maddenin toksik ya da genotoksik etkiye sahip olduğunun öne sürülebilmesi için öncelikli olarak *in vitro* çalışmaların yapılması gerekli olsa da, yüksek yapılı organizmaları temsil edebilecek model organizmalarla *in vivo* çalışmaların yapılması büyük önem taşımaktadır. Bu bakımdan sağladığı pek çok avantaj nedeniyle *Drosophila melanogaster* model bir organizmadır. *Drosophila*, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzeyen bir organizma olduğu için çeşitli kimyasalların yanı sıra bu kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması için de elverişlidir (Rincon ve Graf, 1995). Kullanılan özel soylar sayesinde kimyasalın sadece mutajenik etkisi değil aynı zamanda rekombinojenik etkisi hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir.

Bu çalışmada özellikle endüstride yaygın olarak kullanılan çeşitli çevresel kimyasalların (Bisfenol A (BFA), Nonilfenol (NF), Dietilstilbestrol (DES), 17 β -estradiol (E2), Tribütülin (TBT) ve Methidatyon (MD) olası genotoksik etkilerinin *in vivo* bir test olan *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile araştırılmasının yanı sıra, bu kimyasalların *Drosophila melanogaster* östrojenle ilişkili reseptör (ERR) (estrogen-related receptor) gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır.

5.1. Çevresel Kimyasalların Toksik ve Genotoksik Etkisi

Genetik toksikoloji alanında oldukça sık kullanılan ve sağladığı pek çok avantaj nedeniyle tercih edilen genotoksisite testlerinden biri de *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon (SMART) (kanat benek testi) Testi'dir (Würgler ve Vogel, 1986). SMART ile çok sayıda maddenin toksik, genotoksik veya antigenotoksik etkilerine dair veriler rapor edilmiştir (Idaomar vd., 2002; Kilic ve Yesilada, 2013; Sarıkaya ve Memmi, 2013; Patenkovic vd., 2013).

Çalışma kapsamında belirlenen çevresel kimyasalların SMART ile genotoksik etkilerinin araştırılması amacıyla negatif ve pozitif kontrol grubuyla birlikte çevresel kimyasalların grupları oluşturulmuştur. Bu amaçla çalışma kapsamında kurulan çapraz sonucu elde edilen larvalar eşit koşullar altında çalışmaya alınmıştır. Negatif kontrol grubu olarak distile su, pozitif kontrol grubu olarak da alkilleyici bir ajan olan MMC'nin çeşitli konsantrasyonları (0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM) kullanılmıştır. Ayrıca etanolde ve DMSO'da çözünen kimyasallar dikkate alınarak etanol ve DMSO grupları da çalışmalara eklenmiştir.

SMART, yüksek ökaryotik organizmaların somatik hücrelerinde heterozigotluğun kaybedilmesi ilkesine dayanan oldukça hızlı, ekonomik, somatik mutasyon ve rekombinasyonlara duyarlı olan *in vivo* bir testtir (Demir vd., 2015). Bu test sistemi çeşitli avantajları nedeniyle tercih edilen standart bir yöntemdir (Carmona vd., 2008). Bu test olası mutajenlerin neden olacağı genotoksik etkileri mutant hücre klonları olarak tespit etme olanağı sağlar. Mutant hücre klonları, ergin sineğin kanatlarında delesyonlar, nokta mutasyonlar ve mitotik rekombinasyon sonucu ortaya çıkarak, tekli benek ve ikili benek olarak sınıflandırılır. Tekli benekler *mwh* veya *flr* fenotipindeki hücrelerden oluşur. Tekli benekler arasında 1-2 hücreli olanlar küçük tekli benekler olarak adlandırılırken, 3 ve daha fazla sayıda hücre gruplarından oluşan benekler ise büyük tekli benekler olarak adlandırılır. İkili benekler ise *mwh* ve *flr* fenotipinin her ikisinin birden yan yana hücre gruplarında birlikte bulunduğu beneklerdir. Farklı tipteki benekler farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret gen (*mwh* ve *flr*) arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr* geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Frei ve Würzler, 1988; Graf, 1995).

5.1.1. MMC'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi

Mitomisin-C (MMC) *Streptomyces caespitosus*'tan elde edilen, karsinojenik 'kiron' ve 'oktan' grupları ve 'azoürüdin' halkası taşıyan sitotoksik bir antibiyotiktir (Touati vd., 2013). MMC'nin metabolizasyonu sonucu oluşan metabolitleri, genotoksik etkilere neden olmaktadır. MMC radikal üretimini uyararak, DNA alkilasyonu ile DNA iplikçiklerinde kırılmalara yol açar. Böylece replikasyonu engellemek suretiyle nokta mutasyonlarına neden olmaktadır. Ayrıca hücre döngüsünün G1 ve S fazlarında DNA'yı etkileyerek bölünmeyi bloke etmek gibi

çeşitli genotoksik etkiler de göstermektedir (Yehoyada vd., 2007). Bu çalışmada MMC bilinen genotoksik etkileri nedeniyle kendi deneysel koşullarımız altında SMART'ın çalıştığını göstermek amacıyla pozitif kontrol grubu olarak seçilmiştir. MMC'nin pozitif kontrol grubu olarak kullanıldığı pek çok çalışma rapor edilmiştir (Niikawa vd., 2007a,b; Silva vd., 2014).

Çalışmamızda, çevresel kimyasalların farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan larvaların ergine gelişmeleri izlenmiştir. Bu sayede ergine gelişme sürecinde kimyasalların olası genotoksik etkilerinin yanında, larvaların hayatta kalışı (larvadan ergine gelişen bireylerin oranı) (yaşayabilirlik yüzdesi) üzerine etkisi de araştırılmıştır. Çeşitli kimyasalların olası toksik etkileriyle ilişkili olarak, *Drosophila*'da yaşayabilirlik yüzdesi pek çok çalışmada kullanılmaktadır (Demir vd., 2015; Erciyas vd., 2010; Erciyas ve Sarıkaya, 2009; Gelegen ve Yesilada, 2000).

Çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullanılan MMC'nin 0.025 mM, 0.05 mM ve 0.1 mM uygulama gruplarında hayatta kalış oranları sırasıyla %62, %58 ve %45 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Pozitif kontrol grubu olan MMC'den elde ettiğimiz bulgulara göre; MMC'nin tüm konsantrasyonlarda tüm benek tiplerinde kanat başına düşen benek sayısı önemli ölçüde artmıştır (Çizelge 4.1). Şekil 4.1 de görüldüğü gibi bu artış doz artışına paralel olarak bulunmuştur. Benek sıklıklarındaki bu artış istatistiksel olarak anlamlı olduğundan, tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Çeşitli test sistemlerinde yapılan çalışmalarla da çalışmamıza benzer sonuçlar rapor edilmektedir. Silva vd., 2014, MMC'nin farelerde mikronukleus (MN) frekansını arttırdığını rapor etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise MMC'nin sıçan kemik iliği hücrelerinde belirgin bir genotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir. Yine bu çalışmayla MMC'nin mikronukleus frekansı, kromozom aberasyonlarının yüzdesi ve komet testi ile ölçülen DNA hasar seviyesinde artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Touati vd., 2013). MMC'nin pozitif kontrol olarak kullanıldığı başka bir çalışmada, farede MMC tarafından indüklenen kromozom bozukluklarının mikronukleus testi kullanılarak periferik kan ve kemik iliği hücrelerinde aspirin tarafından baskılandığı rapor edilmiştir (Niikawa vd., 2001).

5.1.2. Etanol ve DMSO'nun Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çalışmamızda, kontrol grubunda %97 olan hayatta kalış oranı, etanol grubunda %93, DMSO grubunda ise %95 olarak bulunmuştur. Etanolün çözücü

olarak kullanıldığı başka çalışmalarda da bizim çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiştir. Creus vd., (1983) yaptıkları bir çalışmada çözücü olarak kullandıkları etanolün, *Drosophila* larvalarının hayatta kalış oranları üzerinde kontrol grubundan çok farklı bir etkiye neden olmadığını bildirmişlerdir. Başka çalışmalarda ise *Drosophila*'da etanolün %10'un üzerindeki konsantrasyonlarında toksik etkisinin arttığı ve buna bağlı olarak hayatta kalış oranını azalttığı rapor edilmiştir (Scholz vd., 2000).

Çalışmamızda kullanılan etanol ve DMSO gruplarında kanat başına düşen benek sayılarında istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3). Etanol grubunda, negatif kontrol grubuna göre toplam benek sayısı sıklığı artmış, ancak bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Bu sonuç, kullanılan etanol konsantrasyonunun (%5) *Drosophila* larvalarında genotoksik etkilere neden olmadığını göstermektedir. Çalışmamıza benzer sonuçlar diğer araştırmacılar tarafından da rapor edilmektedir. SMART ile yapılan ve etanolün çözücü olarak kullanıldığı bir çalışmada, % 7'lik etanol konsantrasyonunun genotoksik etkiye neden olmadığı bildirilmiştir (Kaya vd., 1999).

5.1.3. BFA'nın Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çizelge 4.4 ve görüldüğü gibi çalışmamızda kullandığımız BFA'nın farklı konsantrasyonları için oluşturulan gruplar ile kontrol grubu arasında larvaların hayatta kalış oranları bakımından belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. BFA'nın en yüksek uygulama dozunda (500 mg/L) hayatta kalış oranı %92 olarak bulunmuştur. Bu sonuç farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. *Drosophila* üzerine yapılan bir çalışmada, larvalara uygulanan farklı BFA konsantrasyonlarının (0.1 mg/L, 1 mg/L ve 10 mg/L) larvadan pupaya ve pupadan ergine geçiş yüzdeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı rapor edilmiştir (Atlı, 2010).

BFA ile ilgili farklı araştırmacılar tarafından farklı organizmalar üzerine yapılan çalışmalarla çalışmamıza benzer sonuçlar elde edilmiş olsa da, birbiriyle çelişkili pek çok veri rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada *Xenopus laevis* larvalarına BFA'nın 0.83-497 µg/L arasındaki dozları uygulanmıştır. Çalışma sonucunda BFA'nın uygulanan dozlarının *Xenopus laevis*'in larval büyüme, gelişme ve eşeysel farklılaşması üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir (Pickford vd., 2003). Başka bir çalışmada BFA'nın antioksidan enzimlerini azaltarak fare

karaciğerinde oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir (Bindhumol vd., 2003). Jayashree vd., (2013) erkek albino sıçanlar üzerine yaptıkları bir çalışmada, BFA uygulamasının insülin sinyal iletim yolunda hasara neden olarak, hepatik glukoz oksidasyonunu ve glikojen içeriğini bozduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmayla birlikte BFA uygulamasına bağlı olarak serum testosteron seviyesinde azalma olduğu da rapor edilmiştir.

Çalışmamızda yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda benek sıklıkları bakımından da kontrol grubuyla BFA grupları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

5.1.4. NF'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çalışmamızda kullandığımız NF'nin farklı konsantrasyonları için oluşturulan grupları ile kontrol grubu arasında larvaların hayatta kalış oranları bakımından belirgin bir farklılık gözlenmezken, BFA'nın en yüksek dozunda (500 mg/L) hayatta kalış oranı %92 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5). Bu sonuç farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. *Drosophila*'da yapılan bir çalışmada, larvalara uygulanan farklı NF konsantrasyonlarının (0.1 mg/L, 1 mg/L ve 10 mg/L) larvadan pupaya ve pupadan ergine geçiş yüzdeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı rapor edilmiştir (Atlı, 2010).

Çalışmamızda NF grupları ile kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda benek sıklıkları bakımından anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda, NF'nin genotoksik etkisiyle ilgili çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Araştırmacıların farklı organizmalar ile yaptıkları çalışmalarda, birbiriyle çelişkili olan çok sayıda veri rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmayla NF'nin CHO-K1 hücrelerinde DNA hasarına yol açtığı bildirilmekteyken (Tayama vd., 2008), başka çalışmalarda NF'nin bir balık türü olan *Oreochromis niloticus* üzerinde herhangi bir genotoksik etkiye neden olmadığı (Rivero vd., 2008) bildirilmiştir. Başka bir çalışmada yapılan toksikolojik değerlendirmeler NF'nin fare, *A. cepa*, *D. melanogaster* ve bir yumuşakça türü olan *Biomphalaria tenagophila*' da oldukça toksik bir bileşik olduğunu göstermesine karşın, NF'nin *Allium cepa*'da kromozom aberasyonlarına neden olmadığı gibi, farede mikronukleus frekansında da bir artışa neden olmadığı rapor edilmiştir (Grisolia vd., 2004). Diğer taraftan, NF maruziyetinden sonra bir balık türü olan *Scophthalmus maximus* karaciğeri ve

kanında mikronukleus frekansında önemli bir artış olduğu bildirilmektedir (Barsiene vd., 2006). Diğer yandan aynı balık türünün eritrositlerinde ise NF uygulamasına bağlı olarak mikronukleus frekansında önemli bir artış gözlenmediği rapor edilmiştir (Bolognesi vd., 2006). Yumuşakçalar üzerinde yapılan çalışmalarda ise NF'nin genotoksik etkiye neden olduğu bildirilmiştir (Frassinetti vd., 2011). Bir başka çalışmada da alkil fenollerin mutajenik etkisi Ames Testi ile araştırılmış ve herhangi bir mutajenik etkiye neden olmadıkları rapor edilmiştir (Boyacıoğlu vd., 2007).

5.1.5. DES'in Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çalışmamızda kullanılan tüm DES dozları (1, 5, 6, 7 ve 8 mM) ile kontrol grubu arasında larvaların hayatta kalış oranları bakımından belirgin bir farklılık olduğu gözlenmiştir. Çizelge 4.6 da görüldüğü gibi DES'in toksik etkisi konsantrasyon artışına paralel olarak artmış ve kullanılan en yüksek dozda (8 mM) ise larvaların hayatta kalış oranı %27 olarak bulunmuştur. Bu sonuç diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. *Drosophila* ile yapılan bir çalışmada 5 ve 15 mM DES uygulamasına bağlı olarak larvaların hayatta kalış oranlarının, kontrole kıyasla önemli oranda azaldığı rapor edilmiştir. 5 mM DES uygulaması sonucu larvaların hayatta kalış oranı %68 olarak bulunurken, 15 mM DES uygulaması sonucu ise %57 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Creus vd., 1983).

Çalışmada kullanılan DES dozlarından en yüksek olan 8 mM grubunda küçük tekli benek ve toplam benek sıklıkları bakımından kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenirse de, istatistiksel değerlendirme sonucunda benek sıklıkları açısından anlamlı sonuçlar elde edilememiştir (Çizelge 4.6). Bulgularımıza göre DES'in kullanılan dozlarının hiçbirisi SMART testinde genotoksik etkiye neden olmamıştır. Sentetik östrojen olarak bilinen DES'in, mutajenik potansiyelinin araştırıldığı *in vitro* bir çalışmada ise M13 fajının DNA'sı, DES kinon (DES Q 1.25 mM) ile muamele edilerek *E.coli* hücrelerine transfekte edilmiş ve çalışma sonucunda DES Q'nun rekombinojenik DNA hasarına neden olabileceği rapor edilmiştir (Korah ve Humayun, 1993).

5.1.6. E2'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çizelge 4.7 de görüldüğü gibi çalışmada kullanılan E2'nin toksik etkisi konsantrasyon artışına paralel olarak artmış ve kullanılan en yüksek dozda (10 mM) larvaların hayata kalış oranı %25 olarak bulunmuştur. Bu sonuç farklı organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. *Cichlasoma nigrofasciatum*) balıkları ile yapılan bir çalışmada balıklara 3 ay süre ile 100 ve 200 µg/L 17β-östradiol hormonu immersiye yöntemi ile uygulanmıştır. Aylık periyotlarla balıkların boy ve ağırlıkları belirlenmiş ve deney sonucunda 17β-östradiol'ün balıkların vücut boy ve ağırlığını olumlu yönde etkilediği ancak yüksek konsantrasyonda bu etkinin ortadan kalkarak, yaşama oranının düştüğü rapor edilmiştir (Turan vd., 2005).

Çalışmada kullanılan tüm E2 konsantrasyonlarında (1, 5, 7, 8 ve 10 mM) küçük tekli benek, ikili benek ve toplam benek sıklıkları bakımından kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenirse de, istatistiksel değerlendirmede bu artışın önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.7). Bulgularımıza göre uygulanan E2 konsantrasyonlarının SMART testinde genotoksik etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. E2'nin genotoksik etkilerine yönelik çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, 11 ay boyunca ratlara 18 µmol E2 içeren peletler implante edilmiştir. Deneyin sonucunda E2'nin hipofiz tümörü oluşumunu ve hücre büyümesini uyardığı bildirilmiştir. Ayrıca E2 uygulamasına bağlı olarak meme bezlerine göre rahim hücre büyümesinin daha yüksek oranda uyarıldığı rapor edilmiştir (Mills vd., 2008).

5.1.7. TBT'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çalışmamızda TBT'nin farklı konsantrasyonları için oluşturulan gruplarında, TBT'nin toksik etkisi konsantrasyon artışına paralel olarak artmış ve kullanılan en yüksek dozda (50 mg/L) ise hayatta kalış oranı %30 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). Birçok farklı test sisteminde yapılan çalışmalar, sonuçlarımıza benzer şekilde TBT'nin toksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. TBT maruziyeti sonucu *Sebastiscus marmoratus*'da serbest testosteron seviyesinde ki artışa bağlı olarak, yumurtalık fonksiyonunun ve yumurta gelişiminin etkilendiği Zhang vd. (2013) tarafından rapor edilmiştir.

Çalışmamızda TBT'nin tüm uygulama gruplarının küçük tekli benek ve toplam benek sıklıklarını kontrole kıyasla arttırdığı gözlenmiştir (Çizelge 4.8). Ancak sadece en yüksek TBT dozunda (50 mg/L) gözlenen artış istatistiksel açıdan

önemli olduğundan pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Diğer dozlarda gözlenen benek sıklıkları bakımından, kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan farklılığın önemli olmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda TBT'nin en yüksek dozunun (50 mg/L) küçük tekli benek ve toplam benek sıklığının kontrole kıyasla arttığı gözlenmiştir (Çizelge 4.8). Çalışmamıza benzer sonuçlar farklı *in vitro* ve *in vivo* test sistemleriyle yapılan çalışmalarla da rapor edilmektedir. Bu çalışmalar ile TBT maruziyeti sonucu oksidatif hasara bağlı olarak geri dönüşümsüz DNA kırıklarının olduğu ve bunun sonucunda TBT'nin DNA'da hasara neden olabileceği rapor edilmiştir (Falcioni vd., 2008; Zuo vd., 2012; Morales vd., 2013). Comet testi kullanılarak insan hepatoma G2 hücreleri üzerinde yapılan başka bir *in vitro* çalışmada, TBT maruziyeti sonucu DNA tamir mekanizmasında meydana gelebilecek inhibisyona bağlı olarak, genotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği rapor edilmiştir (Li vd., 2014). Yine çeşitli çalışmalarla TBT'nin sıçanların karaciğer, timüs ve beyin dokusu üzerinde hasara neden olduğu bildirilmiştir (Gupta vd., 2011; Ishihara vd., 2012; Mitra vd., 2013).

5.1.8. MD'nin Toksik ve Genotoksik Etkisi

Çalışmamızda kullanılan MD konsantrasyonlarının (0.01, 0.025, 0.05, 0.06, 0.075 mg/L) toksik etkisi konsantrasyon artışına paralel olarak artmış ve uygulanan en yüksek konsantrasyonda (0.075 mg/L) ise hayatta kalış oranı %36 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Sonuçlarımıza benzer şekilde MD'nin toksik etkiye sahip olduğu birçok farklı test sisteminde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Genel olarak organofosfatlı insektisitler, kolin esteraşı inhibe ederek etkilerini gösterse de, bazı çalışmalarda karaciğer hasarına, lipid peroksidasyonuna ve bazı enzim aktivitelerinde değişikliğe neden oldukları rapor edilmektedir. Mollaoğlu vd., 2003 yaptıkları bir çalışmada MD'nin Wistar Albino cinsi sıçanların pankreası üzerinde hasara neden olabileceğini bildirmişlerdir. Wistar Albino cinsi sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada da, subkronik MD uygulamasının lipid peroksidasyonuna ve damar duvarı hasarına neden olduğu bildirilmiştir (Yavuz vd., 2005). Güngördü (2013), yaptığı bir çalışmada üç farklı kurbağa türünde (*Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* ve *Xenopus laevis*) gelişimin erken aşamalarında MD'nin toksik etkisini karşılaştırmalı olarak araştırmıştır. Çalışmada toksikasyonun belirlenmesinde rol oynayan, GST, AChE, CaE, glutatyon redüktaz, laktat dehidrogenaz ve aspartat aminotransferaz değerleri, 96 saatlik MD maruziyetinden sonra 4 günlük iribaşlarda incelenmiş ve sonuçta MD'nin AChE, GST ve CaE inhibisyonuna neden olarak toksik etkiye neden olduğu rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, araştırmacılar

organofosfatlı bir pestisit olan MD'nin oral yoldan alınması ile oluşan ölümcül zehirlenme vakası üzerinde çalışmışlardır (Takayasu, 2012). Yatağında ölü bulunan 80 yaşındaki bir kişinin yapılan adli otopsisinde sonucunda kayda değer herhangi bir morfolojik değişiklik saptanmadığı ancak kalp kanı, periferik kan, idrar, beyin, akciğer ve karaciğer gibi vücut sıvıları ve organlarda da yüksek oranda MD'ye rastlandığı bildirilmiştir. Toksikolojik veriler kurbanın oral yoldan MD'ye maruz kaldığını güçlü bir şekilde destekleyerek, MD emülsiyonuna bağlı akut zehirlenme olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm MD konsantrasyonlarında küçük tekli benek ve toplam benek sıklıkları bakımından kontrol grubuna kıyasla bir artış gözlenirse de, istatistiksel değerlendirme sonucunda benek sıklıkları açısından bu artışın önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.9). Bulgularımıza göre uygulanan MD konsantrasyonlarının hiçbirinin SMART testinde genotoksik etkiye neden olmadığı bulunmuştur.

Çalışmamızdan SMART'tan elde ettiğimiz bulgulara göre; BFA, NF, DES, E2 ve MD *Drosophila*'da herhangi bir genotoksik etkiye neden olmazken, TBT'nin en yüksek konsantrasyonunun küçük tekli benek ve toplam benek sıklığı bakımından genotoksik etkilere neden olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak çevremizde bulunan ve sıklıkla maruz kaldığımız çevresel kimyasalların olası toksik ve genotoksik etkilerini ortaya koymak için *in vitro* çalışmaların yanında *in vivo* test sistemleri ile de ayrıntılı araştırmaların yapılması büyük önem taşımaktadır. Sahip olduğu enzim sistemleri ve genetik mekanizmaları nedeniyle en çok tercih edilen model organizmalardan biri olan *D. melanogaster* ile yapılan bu *in vivo* çalışmanın çevresel kimyasallardan olan BFA, NF, DES, E2, TBT ve MD'nin olası toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

5.2. Çevresel Kimyasalların *ERR* Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Nükleer hormon reseptörleri (NR) temel gelişimsel ve fizyolojik yol ağlarını kontrol eden transkripsiyon faktörleridir. Endokrin bozucu özelliğe sahip olan kimyasalların ilk hedeflerinden biri olan NR'ler, hormon sisteminde kritik fonksiyonları yerine getiren proteinlerin bir grubudur. Çeşitli maddeler tarafından bu reseptörlerde meydana gelecek herhangi bir değişiklik, kanser, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok patolojik durumla yakından ilişkilidir (Paterni vd., 2014; Necakov, 2010).

ER'ler ile benzer dizilere sahip olan, ERR'ler nükleer reseptörlerin bir grubudur. *D. melanogaster*'in genomu bu grubun ERR ortoloğu olan tek bir üyesini kodlar ve bu grubun üyeleri bir atasal genden orjinlenmiş olabilir (Giguera, 2002) *Drosophila*'da ERR geni, ligand bağlayıcı bölgenin (LBB) başlangıcında ekzon varlığına ya da yokluğuna göre iki izoform olarak ifade edilir (*dERR A* ve *dERR B*). *Drosophila*'da ERR geninin ifadesi en erken yumurtlamadan hemen sonra saptanabilir (Tennessee vd., 2011).

Her geçen gün artan çeşitleri ile karşılaştığımız çevresel kimyasalların endokrin bozucu etkilerinin güvenilir test sistemleri ile çalışılarak sonuçlarının tartışılması gereklidir. Çalışmamızın bu bölümünde çevresel kimyasalların *Drosophila* ERR gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Özellikle model organizma olarak kullanılan *Drosophila*'nın ökaryotik olması, genetik yapısının büyük oranda insan genetik yapısı ile benzerlik gösteriyor olması, yapılan *in vivo* çalışmanın önemini arttırmaktadır. Literatürde, çalışmamızda kullandığımız çevresel kimyasalların ERR gen ifadesi etkisine yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu anlamda model organizma olarak *Drosophila*'nın kullanıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan çalışmamız ilk olma özelliği taşımaktadır.

5.2.1. Etanol ve DMSO'nun *ERR A* ve *ERR B* Gen İfadesi Üzerine Etkisi

Kimyasalları çözmek için kullandığımız etanolün kontrole kıyasla *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir. Ancak DMSO'nun *ERR A* gen ifadesinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10).

Literatürde DMSO'nun ERR gen ifadesini etkilediğine dair çalışmaya rastlanmamıştır. SMART'tan elde ettiğimiz bulgular, DMSO'nun *Drosophila*'da

toksik ya da genotoksik etkiye neden olmadığını göstermiştir (Çizelge 4.3). Ancak bilindiği gibi toksisite, genotoksisite ve gen ifadesinin düzenlenmesi birbirinden bağımsız mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. Bu bağlamda DMSO'nun toksik ya da genotoksik etki göstermemesi, gen ifadesi üzerinde de herhangi bir farklılığa neden olmayacağı anlamını taşımaz. Ayrıca, DMSO'nun ERR gen ifadesine etkisinin; maruziyet süresi, model olarak kullanılan organizma ve uygulamanın yapıldığı gelişim evresi gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği söylenebilir.

5.2.2. BFA'nın *ERR A* ve *ERR B* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çizelge 4.10 da görüldüğü gibi BFA'nın 12.5 mg/L ve 100 mg/L dozları *Drosophila*'da hem *ERR A* hem de *ERR B* gen ifadesini önemli ölçüde arttırmıştır.

Başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da bulgularımıza benzer sonuçlar elde edilmektedir. Bu çalışmalardan birinde bir böcek türü olan *Chironomus riparius* larvaları, kısa periyot (24 saat) ve uzun periyot (96 saat) olmak üzere 5 µg/L, 50 µg/L ve 500 µg/L konsantrasyonlarında BFA'ya maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda ERR gen ifadesi gerçek zamanlı PZR ile analiz edilerek, hem kısa periyot, hem de uzun periyot uygulamalarında BFA'nın konsantrasyona bağlı olarak ERR gen ifadesinde önemli bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Park ve Kwak, 2010).

Östrojen agonisti olarak bilinen BFA'nın insanlarda çok düşük dozlarda bile endokrin bozucu etkiye sahip olup, ER ifadesini aktive ettiği rapor edilmektedir (Liu, 2014). Ancak BFA'nın ER'ye bağlanma yeteneği ve hormonal aktivitesi doğal hormonlardan yaklaşık olarak 1000-10 000 kez daha zayıftır. Dolayısıyla BFA östrojen reseptörü için etkisiz bir ligand olmasına karşın, güçlü bir şekilde ERRγ'ya bağlanabildiğini gösteren çalışmalar vardır. Bu sonuçlar fenol türevlerinin özellikle ERRγ'ya bağlanabilme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (Park ve Kwak, 2010).

Bilindiği gibi östrojenik etki meme kanseri gelişiminde en önemli risk faktörlerinden biridir. Bu anlamda, BFA'nın doğrudan östrojen bağımlı hücresel tümör büyümesine neden olabileceği gibi, meme dokusunda doğrudan morfolojik bir değişiklik yapmaksızın, moleküler değişikliklere yol açabileceği rapor edilmiştir (Durmaz ve Giray, 2013).

5.2.3. NF'nin *ERR A* ve *ERR B* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda NF'nin 0.5 mg/L ve 12.5 mg/L konsantrasyonlarının *ERR A* gen ifadesinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir artışa neden olduğu, ancak *ERR B* gen ifadesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

Bir böcek türü olan *Chironomus riparius* ile yapılan bir çalışmada NF (1, 10 ve 100 µg L⁻¹)'nin *ERR* gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. *C. riparius* larvaları 24 saat 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda NF'ye maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucunda *ERR* gen ifadesi gerçek zamanlı PZR ile analiz edilerek, hem 24 ve hem de 96 saatlik uygulama sonucunda NF'nin *ERR* gen ifadesinde önemli bir artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Park ve Kwak, 2010).

Pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmayla NF'nin östrojenik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Erkek gökkuşağı alabalığının kültüre edilmiş hepatositleri kullanılarak yapılan *in vitro* bir çalışmada, NF'nin ER'lerin ifadelerini indüklediği gösterilmiştir (Madigou vd., 2001). 100 µg L⁻¹ 4-NF maruziyetinin zebra balıklarını hem larval evresinde hem de yetişkin evrede ERα ifadesini önemli ölçüde indüklediği bildirilmiştir (Jin vd., 2009). Yine başka bir çalışmada 10-1000 nM arasında değişen konsantrasyonlarda 4-NF uygulamasının *Gobiocypris rarus* juvenillerinde ERβ'nin gen ifadesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Wang vd., 2011).

NF'nin ER gen ifadesine etkisini belirlemek için yapılan başka bir çalışmada, *Solea solea* kısa süreli olarak 10⁻⁶M NF'ye maruz bırakılmıştır. Çalışma sonucu ERβ gen ifadesinde önemli oranda bir artışın olduğu bildirilmiştir. Çalışmada kseneöstrojenlerin östrojenik aktivitesini belirlemede biyobelirteç olarak kullanılan plazma vitellojen seviyesinde de bir artış olduğu rapor edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışma kapsamında özellikle kseneöstrojen kaynaklı vitellojen üretiminin düzenlenmesinde ERβ'nin işlevsel bir role sahip olduğu rapor edilmiştir. (Palermo vd., 2012).

5.2.4. DES'in *ERR A* ve *ERR B* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda sentetik östrojen olarak bilinen DES'in, *ERR A* gen ifadesi üzerinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye neden olmazken, 5 mM ve 8mM konsantrasyonlarının *ERR B* gen ifadesini arttırdığı belirlenmiştir. En yüksek DES konsantrasyonunun (10 mM) ise gen ifadesinde anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.10).

DES'in ER ve ERR gen ifadesi üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farelere uygulanan 1µM DES'in *ERRβ*'nin ifadesini inhibe ederken, *ERα*, *ERβ* ve *ERRγ* üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir. 10 µM DES uygulmasının ise *ERα*, *ERβ*'nin gen ifadesini önemli ölçüde arttırdığını, *ERRα*, *β* ve *γ* gen ifadelerini ise azalttığı rapor edilmiştir (Hao vd., 2012).

Bilindiği gibi ERR'ler her ne kadar ER'ler ile ortak DNA bağlanma bölgeleri içerselerde, ERR'lerin doğal ve sentetik ligandları tam olarak tanımlanamamıştır (Park vd., 2009). ER'ler ile oldukça yakın yapısal benzerliklerine rağmen, östradiol ya da diğer doğal östrojenler ERR ligandı değildir. Bu bağlamda literatürde DES'in ERR'lerin aktivitelerini inhibe ettiğine dair veriler vardır. Yapılan çalışmalar DES'in ERR'lere bağlanarak ters agonist özellik gösterdiğini ve aktivitelerini inhibe ettiğini göstermektedir. Bu anlamda DES'in koregülatörler ve ERR arasındaki bağlanmayı bloke ederek, transkripsiyonel aktivasyonun kaybına, dolayısıyla ERR aktivitesinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Hirvonen vd., 2011).

Bu anlamda çalışmamız DES'in ERR gen ifadesi üzerine etkilerinin *Drosophila*'da araştırıldığı ilk çalışma olma niteliği taşımaktadır. Dolayısıyla DES'in ERR gen ifadesiyle ilgili literatürde yer alan verilerden farklı bulgular gözlemlemiş olmamız, model organizma olarak *Drosophila* kullanmamızla ilişkili olabileceği gibi, DES'e maruz kalan *Drosophila*'nın gelişim evresine ve maruziyet süresine bağlı olarak da değişkenlik göstermiş olabilir.

Çalışmamızda ikinci instar evresindeki larvalar, 24 saat süreyle DES'in farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Uygulama süresinin daha uzun ya da kısa olduğu durumlarda, ya da larval fazın ikinci instar evresinden ileriki safhalarda (üçüncü instar larva, pupa ve ergin) ERR gen ifadesine ilişkin farklı sonuçlar elde edilmesi muhtemeldir. Yapılan araştırmalar, özellikle *ERRα*'nın ergin bireyde geniş oranda ifade edildiğini, *ERRβ*'nin ise gelişimin daha erken safhalarında yüksek oranda ifade edildiğini göstermektedir. Gelişimin ileriki safhalarında ve özellikle

memelilerde doğum sonrası hayatta yüksek oranda kısıtlandığını göstermektedir (Giguere, 2002). Bu bakımdan gelişimin erken safhalarından olan ikinci instar evresindeki larvalara uygulanan DES konsantrasyonlarının, *ERR B* gen ifadesinde kontrol grubuna göre artışa neden olması, *ERR B* geninin *Drosophila*'nın ikinci instar evresinde daha yüksek oranda ifade edilmesinden kaynaklandığını söyleyebiliriz.

5.2.5. E2'nin *ERR A* ve *ERR B* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda doğal östrojen olarak tanımlanan E2'nin hiçbir konsantrasyonunun (1 mM, 5 mM ve 10 mM) *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesinde kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı gözlenmiştir.

Literatürde yer alan çalışmalar, bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Bilindiği gibi E2, ER'lere (ER α ve ER β) bağlanarak etki gösterir (Lapense vd., 2010). Temelde ER'ler ile benzer dizilere sahip olmaları ile tanımlanan ve steroid hormon reseptörlerinin alt grubuna dahil olan ERR'ler, ER'ler ile sentetik östrojen ligandlarına bağlanmayı da içeren pek çok yapısal ve işlevsel özellikleri paylaşmalarına rağmen, östrojeni (E2) bağlayamazlar. (Liu vd., 2014; Park ve Kwak, 2010; Duellman vd., 2010).

Dolayısıyla çalışmamızda kullandığımız E2'nin, ERR'ye bağlanamadığı için *Drosophila*'da *ERRA* ve *ERRB* gen ifadelerinde, kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığını söyleyebiliriz.

5.2.6. TBT'nin *ERRA* ve *ERRB* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çalışmamızda bir organotin bileşiği olan TBT'nin en düşük konsantrasyonu olan 1 mg/L'nin, kontrol grubuna kıyasla *ERR A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalışa neden olduğu gözlenmiştir. TBT'nin diğer dozları (10 mg/L ve 50 mg/L) ise gen ifadesi üzerine herhangi bir farklılığa neden olmamıştır (Çizelge 4.10). Dolayısıyla TBT'nin *ERR A* gen ifadesi üzerine etkisinin konsantrasyon artışına bağlı olmadığı gözlenmiştir. Literatürde TBT'nin gen ifadesi üzerine etkisinin konsantrasyondan bağımsız olduğuna dair verilerin rapor edildiği birçok çalışma vardır. ERR'lerin ER'ler ile benzer dizilere sahip olduğu dikkate alındığında, ER genlerinin ifadeleri ile ilgili çalışmalardan elde edilen veriler büyük önem taşımaktadır.

Yapılan bir çalışmada TBT'nin; 1, 10 ve 100 ng L⁻¹ konsantrasyonlarının *Sebastiscus marmoratus* erkeklerinde östrojen reseptörü olan ER gen ifadesini konsantrasyona bağlı olarak etkilerken, dişi bireylerde gen ifadesi üzerine herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir. *S. marmoratus* erkeklerinde TBT'nin 1 ve 10 ng L⁻¹ konsantrasyonunun ER α gen ifadesini önemli oranda arttırdığı, en yüksek konsantrasyon olan 100 ng L⁻¹'nin ise gen ifadesi üzerine herhangi bir etkiye neden olmadığı rapor edilmiştir. Aynı konsantrasyonların ER β gen ifadesi üzerine etkileri araştırıldığında ise sadece 1 ng L⁻¹ konsantrasyonunun gen ifadesini arttırdığı, diğer konsantrasyonların ER β üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2013).

Literatürde, uygulama konsantrasyonunun yanı sıra, uygulama süresinin de gen ifadesi üzerinde önemli etkilere neden olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada organoklorinlerden pentaklorofenol (PCP)'ün *C. riparius* larvalarında ERR gen ifadesi üzerine etkisi araştırılmıştır. PCP'nin 25 μ g/L ve 250 μ g/L konsantrasyonlarına 12 ve 24 saat süreyle maruz bırakılan larvalarda ERR gen ifadesinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken, aynı konsantrasyonlara 96 saat süreyle maruz kalan larvaların ERR gen ifadesinde önemli oranda bir artış olduğu bildirilmiştir (Morales vd., 2014).

TBT kaynaklı endokrin sistemle meydana gelen değişiklikler tam olarak aydınlatılamamış olsa da, birkaç muhtemel hipotez öne sürülmüştür. Bu anlamda, TBT'nin östradiolün ER'ye bağlanmasını inhibe ederek, ER ve koaktivatör ile etkileşime girip hedef genin ifadesini düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca TBT'nin üreme fonksiyonlarını etkileyerek, insan koryokarsinoma hücrelerinde aromataz aktivitesinin artışını indüklediği rapor edilmiştir (Zhang vd., 2013).

5.2.7. MD'nin *ERR A* ve *ERR B* Genlerinin İfadeleri Üzerine Etkisi

Çizelge 4.10 da görüldüğü gibi MD'nin *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesine etkisi, MD çözeltisi hazırlanırken çözücü olarak DMSO kullandığımız için, hem kontrol grubu hem de DMSO grubuna göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelerden farklı bulgular elde edilmiştir. Buna göre MD'nin kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucunda *ERR B* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlenirken, *ERR A* gen ifadesinde herhangi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. MD'nin DMSO grubu ile karşılaştırılması sonucunda ise *ERR A* gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış olduğu gözlenirken, *ERR B* gen ifadesinde

herhangi bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Bu bulgulara göre, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, MD'nin ERR gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu, DMSO grubu ile karşılaştırıldığında ise gen ifadesinde anlamlı bir azalışa neden olduğu gözlenmiştir.

Bilindiği gibi MD, organizma üzerindeki asıl etkisini AChE enzimini inhibe ederek gerçekleştirir (Güngördü, 2013). Bu bağlamda, literatürde MD'nin, östrojenik etkiye sahip olduğuna dair herhangi bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre, MD'nin ERR gen ifadesine etkisi, uygulama yapılan model organizmaya, uygulama konsantrasyonuna, süresine ve uygulamanın yapıldığı gelişim evrelerine göre değişkenlik gösterebileceği söylenebilir.

Yapılan pek çok çalışma sonucunda, $ERR\alpha$ 'nın hedef genler, koregülatör proteinler ve DNA bağlanma bölgeleri kapsamında $ER\alpha$ ile ortak hedeflere sahip olabileceğine dair veriler elde edilmiştir. Dolayısıyla, özellikle $ERR\alpha$ 'nın ortak DNA bölgeleri ve koregülatörler için $ER\alpha$ ile yarışa girerek, $ER\alpha$ aracılı sinyal yolağı ile etkileşime neden olduğu gösterilmiştir (Yıldırım, 2011).

Memelilerde bulunan her üç ERR'de (α , β , γ) kanser süreciyle ilişkili olup, yükselmiş ERR ifadesi meme kanserinin agresif formlarıyla ilişkilidir. Özellikle artmış $ERR\gamma$ ifadesi meme kanserinin teşhisinde kullanılan önemli bir veridir. Bununla birlikte özellikle $ERR\alpha$ 'nın hormonlarla ilişkili olan meme, kolorektal, ovaryum, prostat ve endometriyal kanserlerinin gelişiminde rol oynadığı rapor edilmiştir (Tennessen vd., 2011). Literatürde artan $ERR\alpha$ ifadesinin özellikle prostat kanseri gelişiminde büyük role sahip olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yine çeşitli çalışmalarla spesifik olarak $ERR\alpha$ 'yı inhibe eden $ERR\alpha$ antagonistlerinin, gelecekte olası terapötik ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Yıldırım, 2011).

Bilindiği gibi sayısız mekanizma ile hedef hücrede östrojenin aktivitesi düzenlenebilir. Örneğin, seçici östrojen reseptör modülatörü (SERM) olarak bilinen 4-OH tamoksifen, meme kanseri hücrelerinde $ER\alpha$ antagonisti olarak rol almaktadır. Ancak literatürde 4-OH tamoksifenin aynı zamanda endometrium kanser sıklığında artışa neden olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Dolayısıyla östrojenlerin gen ve hücre düzeyindeki etkilerine dair veriler, bu etkilerin büyük oranda koregülatör varlığına bağlı olduğunu da göstermektedir (Romano vd., 2010).

Pek çok laboratuvar ve alan çalışmaları çevresel östrojenlere maruziyet sonucu gözlenen değişiklikleri bilmemize yardımcı olmaktadır. Östrojenik aktiviteye sahip olan bu kimyasalların ortak özellikleri bir aromatik halkaya sahip olmalarıdır. Bunun dışında başka yapısal benzerlikleri yoktur. Bu bağlamda, kimyasal yapılarındaki bu farklılık nedeniyle bu kimyasalların etki mekanizmalarıyla ilgili çok az sayıda kesin bilgi bulunmaktadır (Shyu vd., 2011).

Özellikle insanlarda yüksek sıklıkta gözlenen kanserin ve üreme bozukluklarının steroid ve fenolik bileşikler içeren ve özellikle içme suyu yoluyla vücuda alınan östrojenik bileşiklerden kaynaklandığı düşünülecek olursa, bu kimyasalların özellikle *in vivo* çalışmalarla etki mekanizmalarını anlayabilmek büyük önem taşımaktadır (Nie vd., 2014). Bu bakımdan sahip olduğu genetik mekanizmaları nedeniyle en çok tercih edilen model organizmalardan biri olan *D. melanogaster* ile yapılan bu *in vivo* çalışmanın, çevresel kimyasallardan olan BFA, NF, DES, E2, TBT ve MD'nin araştırmamızın konusu olan ERR geninin ifadesi üzerine etkileri *D. melanogaster*'de ilk kez araştırılmıştır. Bu açıdan çalışmamız, çevresel kimyasallara maruziyet sonucu oluşabilecek sonuçlara dikkat çekilmesi ve bu alanda yapılacak olan başka çalışmalara öncülük etmesi bakımından önem taşımaktadır. İlave olarak çalışmamızın çevresel kimyasalların, *ERR A* ve *ERR B* gen ifadesine etkisinin *Drosophila*'nın farklı gelişim evrelerinde ve farklı maruziyet sürelerinde değerlendirilerek çeşitlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Altunkaynak, B.Z., Ünal, D., Aksak, S., Ünal, B. (2012). Östrojen hormonu ve menopoz. *J. Exp. Clin. Med.* **29**, 252-256.
- Altuntas, I., Delibas, N., Sutcu, R. (2002). The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, 681- 685.
- Aly, H.A.A., Domènech, O., Banjar, Z.M. (2012). Effect of nonylphenol on male reproduction: Analysis of rat epididymal biochemical markers and antioxidant defense enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **261**, 134–141.
- Andrade, L.R., Brito, A.S., Gouvea, A.M., Melero, A.M.G.S., Zanin, H., Ceragioli, H.J., Baranauskas, V., Cunha, K.S., Irazusta, S.P. (2014). Absence of mutagenic and recombinagenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **99**, 92–97.
- Ashburner, M., Thompson, J.R. (1978). The Laboratory Culture of *Drosophila*, In The Genetics and Biology of *Drosophila*, M. Ashburner, T. R. F. Wright, Academic Press Inc. Ltd., London, **2a**, 2-81.
- Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. (2012). Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicol. Lett.* **210**, 141-154.
- Atlı, E. (2010). Investigations of the effects of some environmental estrogens on the development and longevity in *Drosophila melanogaster*. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Balakrishnan, B., Thorstensen, E., Ponnampalam, A., Mitchell, M.D. (2011). Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta.* **32**, 788-792.
- Bannister, R., Beresford, N., Granger, D.W., Pounds, N.A., Rand-Weaver, M., White, R., Jobling, S., Routledge, E.J. (2013). No substantial changes in estrogen receptor and estrogen-related receptor orthologue gene transcription in *Marisa cornuarietis* exposed to estrogenic chemicals. *Aquat. Toxicol.* **140– 141**, 19– 26.
- Baran, M.S., Kocabağlı, N. (2000). Yemlerdeki östrojenik etkili maddeler ve hayvanlar üzerindeki etkileri. *İstanbul Univ. Vet. Fak. Derg.* **26 (1)**, 141-148.
- Barsiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Andreikenaite, L., Andersen, O.K. (2006). Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. *Aquat. Toxicol.* **78**, 99–104.
- Bayraktar M. (1996). *Endokrin over hastalıkları, “Endokrinoloji Temel ve Klinik”* Medical Network & Nobel. Ankara, s. 669-684.
- Benachour, N., Aris, A. (2009). Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **241**, 322–328.

Bernards, A., Hariharan, I.K. (2001). Of flies and men — studying human disease in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 274–278.

Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A.M., Perrotti, L.I., Mandal, S.S. (2014). Bisphenol-A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOTAIR *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid Biochem.* **141**, 160–170.

Bindhumol V., Chitra, K.C., Mathur, P.P. (2003). Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*. **188**, 117–24.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquat. Toxicol.* **78**, 93–98.

Bosquiazzo, V.L., Vigezzi, L., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. (2013). Perinatal exposure to diethylstilbestrol alters the functional differentiation of the adult rat uterus. *J. Steroid Biochem.* **138**, 1–9.

Boyacıoğlu, M., Arslan, Ö.Ç., Parlak, H., Karaaslan, M.A. (2007). Mutagenicity of Nonylphenol and Octylphenol Using Salmonella Mutation Assay. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Science*. **24**, (3-4): 299-302.

Bozcuk, A.N. (1976). *Drosophila melanogaster* Meig (Diptera: Drosophilidae) Yaşlanması ve Orgel Hipotezi Üzerinde Araştırmalar. Doçentlik Tezi, Ankara.

Capaldo, A., Gay, F., Valiante, S., Falco, M.D., Sciarrillo, R., Maddaloni, M., Laforgia, V. (2012). Endocrine-disrupting effects of nonylphenol in the newt, *Triturus carnifex* (Amphibia, Urodela). *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol.* **155**, 352-358.

Carmona, E.R., Kossatz, E., Creus, A., Marcos, R. (2008). Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the *Drosophila* wing spot test. *Chemosphere*. **70**, 1910–1914.

Carwile, J.L., Michels, K.B. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003–2006. *Environ. Res.* **111**, 825-830.

Chen, Y., Zuo, Z., Chen, S., Yan, F., Chen, Y., Yang, Z., Wang, C. (2008). Reduction of spermatogenesis in mice after tributyltin administration. *Toxicol.* **251**, 21–27.

Chigziola, C., Meroni, P.L. (2012). The role of environmental estrogens and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*. **11**, A493- A501.

Clark, A.M., Rockstein, M. (1964). Aging in insects. *Physiology of insects*. **1**, 227-281.

Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R. (2004). The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour*. **68**, 665-676.

Creus, A., Xamena, N., Marcos, R. (1983). Positive response of diethylstilbestrol in the sex-linked recessive lethal assay in *Drosophila* after larval feeding. *Mutat. Res.* **122**, 309-313.

Çek, Ş., Sarıhan, F. (2010). Endokrin Sistemi Bozan Kimyasallardan Cinsiyet Steroidlerinin Balıklardaki Etkileri. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi.* **27**, 1: 41-46.

Çetinkaya, S. (2009). Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi.* **36**, 1 (59-66).

Demir, E., Aksakal, S., Turna, F., Kaya, B., Marcos, R. (2015). In vivo genotoxic effects of four different nano-sizes forms of silicananoparticles in *Drosophila melanogaster*. *J. Hazard. Mater.* **283**, 260–266.

Demir, E., Marcos, R., Kaya, B. (2012). Genotoxicity studies in the ST cross of the *Drosophila* wing spot test of sunflower and soybean oils before and after frying and boiling procedures. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 3619–3624.

Demirdöğen, B.C. (2010). Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz 1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi.* **67** (2), 97-112.

Demirsoy, A. (1982). *Yaşamın Temel Kuralları: Omurgasızlar, cilt II*. Hacettepe Üniversitesi Yayını, Ankara, 41p.

Derelanko, M.J., Hollinger, M.A. (Editors). (2002). *Handbook of Toxicology*. CRC Pres.

Díaz, E.C., Ruiz, R.G., Malagón, M.M., Simonet, B.M., Valcárcel, M. (2014). Effects of the interaction of single-walled carbon nanotubes with 4-nonylphenol on their in vitro toxicity. *J. Hazard. Mater.* **275**, 107–115.

Doğan, E. (2008). *Bazı Flavanoidlerin Drosophila melanogaster’de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Duellman, S.J., Calaoagan, J.M., Sato, B.G., Fine, R., Klebansky, B., Chao, W.R., Hobbs, P., Collins, N., Sambucetti, L., Laderoute, K.R. (2010). A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor α (ERR α). *Biochem. Pharmacol.* **80**, 819–826.

Durmaz, E., Giray, B.K. (2013). Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi.* **56**, 192-199.

Erciyas, A.F., Erciyas, K., Sarıkaya, R. (2010). Genotoxicity of two mouthwash products in the *Drosophila* Wing-Spot Test. *Food Chem. Toxicol.* **48**, 2577-2580.

Erciyas, K., Sarıkaya, R. (2009). Genotoxic evaluation of sodium fluoride in the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2860-2862.

Ergün, S.S. (2013). *Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Sığrlarda Gamet Fizyolojisine Olan Etkileri*. Doktora tezi, Afyon Kocatepe üniversitesi, Afyon.

Erhard, H.W., Rhind, S.M. (2004). Prenatal and postnatal exposure to environmental pollutants in sewage sludge alters emotional reactivity and exploratory behaviour in sheep. *Sci. Total Environ.* **332**, 101– 108.

Erkekoğlu, P., Giray, B.K. (2012). Bisfenol A' nın Endokrin Bozucu Etkileri. *Toksikoloji Bülteni*. Sayı:35.

Esener, O.B.B. (2007). *Çevresel Östrojenlerin Erkek Kanatlı Hayvanların Genital Organları Üzerine Etkisi*. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Espinosa, M.J.L., Freire, C., Arrebola, J.P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M.F., Ballesteros, O., Prada, R., Olea, N. (2009). Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*. **76**, 847–852.

Falakalı, B. (1989). *Drosophila Genetiği*. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, İzmir, s. 1-10.

Falcioni, M.L., Pellei, M., Gabbianelli, R. (2008). Interaction of tributyltin(IV) chloride and a related complex [Bu₃Sn(LSM)] with rat leukocytes and erythrocytes: effect on DNA and on plasma membrane. *Mutat. Res.* **653**, 57–62.

Ferguson, S.A., Flynn, K.M., Delclos, K.B., Newbold, R.R. (2000). Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 583–591.

Ferreira, M., Blanco, L., Garrido, A., Vieites, J.M., Cabado, A.G. (2013). In vitro approaches to evaluate toxicity induced by organotin compounds Tributyltin (TBT), Dibutyltin (DBT), and Monobutyltin (MBT) in neuroblastoma cells. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 4195–4203.

Frassinetti, S., Barberio, C., Caltavuturo, L., Fava, F., Gioia, D.D. (2011). Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this test to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **74**, 253–258.

Frei, H., Würzler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.* **203**, 297-308.

Gelegen, L., Yeşilada, E. (2000). *Drosophila Melanogaster*'in Bazı Gelişimsel Özellikleri Üzerine Kadmiyum Nitratın Etkisi. *Turk. J. Biol.* **24**, 585-591.

Giguere, V. (2008). *Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors*. *Endocr Rev.* **29**(6), 677-96.

Giguere, W. (2002). To ERR in the estrogen pathway. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. **13**, 5.

Gökalt, O., Mollaoğlu, H., Yılmaz, H.R., Altuntaş, I. (2003). Organofosfat insektisit Fenthion'un rat amilaz ve lipaz enzimleri üzerine etkisi: Vitamin E ve C'nin rolü. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. **10** (2), 21-23.

Göktekin, E., Barlas, N. (2008). Histopathological effects of 4-*tert*-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal, pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 199–205.

Göze, İ., Göze, F., Çolak, A. (2000). Dietilstilbestrol uygulanan farelerde kromozomal aberasyonlar ve genital histopatolojilerinin incelenmesi. *The Turkish Journal of Pathology*. **16** (1-2), 5-9.

Graf, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation. *Experientia*. **51**, 168-173.

Graf, U., Schaik, N.V. (1992). Improved high bioactivation crossfor the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **271**, 59-67.

Graf, U., Singer, D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Revistan Internacinol de Contamination Ambiental*. **8**, 15-27.

Graf, U., Würzler, F.E. (1996). The somatic white-ivory eye spot does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **27**, 219-226.

Graf, U., Würzler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B., Kale, P.G. (1984). Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **6**, 153-188.

Grisolia, C.K., Bilich, M.R., Formigli, L.M. (2004). A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **59**, 123–126.

Gui, Y., Grant, A. (2008). Join effects of density depence and toxicant exposure on *Drosophila melanogaster* populations. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **70**, 236-243.

Gupta, M., Dwivedi, U.N., Khandelwal, S. (2011). C-Phycocyanin: an effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicol. Lett.* **204**, 2–11.

Guterres, Z.R., Silva, A.F.G., Garcez, W.S., Garcez, F.R., Fernandes, C.A., Garcez, F.R. (2013). Mutagenicity and recombinogenicity of *Ocotea acutifolia* (Lauraceae) aporphinoid alkaloids. *Mutat. Res.* **757**, 91– 96.

Gülnaz, O. (2006). *Bisfenol A'nın Biyolojik Parçalanması, Biyokonsantrasyon Faktörleri ve Östrojenik Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi*. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Güney, M., Demirin, H., Oral, B., Özgüner, M., Bayhan, G., Altuntas, I. (2007). Ovarian toxicity in rats caused by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum. Exp. Toxicol.* **26**: 491–498.

Güngördü, A. (2007). *Karakaya Baraj Gölünün Su Kalitesinin Ekotoksikolojik Yaklaşımla Değerlendirilmesi*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Güngördü, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis*, and *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* **140–141**, 220–228.

Gyllenhammar, I., Glynn, A., Darnerud, P.O., Lignell, S., Delft, R.V., Aune, M. (2012). 4-Nonylphenol and bisphenol A in Swedish food and exposure in Swedish nursing women. *Environ. Int.* **43**, 21–28.

Hamamcı, D. (1993). *Drosophila melanogaster Oregon Yabanıl Tipi ve Vestigal Mutantı Arasında Ömür uzunluğu; antioksidan Enzimlerin ve ACE Vitamin Kompleksinin Yaşlanma ile Olan İlişkileri*. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.

Hammes, B., Laitman, C.J. (2003). Diethylstilbestrol, (DES) update: recommendations for the identification and management of DES-exposed individuals. *Journal of Midwifery and Women's Health.* **48**, 19–29.

Hao, C.J., Cheng, X.J., Xia, H.F., Ma, X. (2012). The endocrine disruptor diethylstilbestrol induces adipocyte differentiation and promotes obesity in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **263**, 102–110.

Henderson, D.S. (2004). *Drosophila Cytogenetic Protocols*. Humana Press. p 389.

Hirsch-Ernst, K.I. (2011). Assessment strategies and decision criteria for pesticides with endocrine disrupting properties relevant to humans. *Reprod. Toxicol.* **31**, 574–584.

Hirvonen, J., Rajalin A.M., Wohlfahrt G., Adlercreutz, H., Wahala, K., Aarnisalo, P. (2011). Transcriptional activity estrogen-related receptor γ (ERR γ) is stimulated by the phytoestrogen equol. *J. Steroid Biochem.* **123**, 46–57.

Hu, L., Cheng, Q., Chen, D., Ma, M., Wu, K. (2015). Liquid-phase exfoliated graphene as highly-sensitive sensor for simultaneous determination of endocrine disruptors: Diethylstilbestrol and estradiol. *J. Hazard. Mater.* **283**, 157–163.

Huang, Y.Q., Wong, C.K.C., Zheng, J.S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., Wong, M.H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ. Int.* **42**, 91–99.

Idaomar, M., El Hamssa, R., Bakkali, F., Mezzouga, N., Zhiri, A., Baudoux, D., Muñoz-Serrano, A., Liemans, V., Alonso-Moraga, A. (2002). Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **513**, 61–68.

Ishihara, Y., Kawami, T., Ishida, A., Yamazaki, T. (2012). Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem. Int.* **60**, 782–790.

Izumi, N., Yanagibori, R., Shigeno, S., Sajiki, J. (2008). Effects of Bisphenol A on the development, growth and sex ratio of the housefly *Musca Domestica*. *Environ. Toxicol. Chem.* **27**:6, 1343-1353.

Jayashree, S., Indumathi, D., Akilavalli, N., Sathish, S., Selvaraj, J., Balasubramanian, K. (2013). Effect of Bisphenol-A on insulin signal transduction and glucose oxidation in liver of adult male albino rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **35**, 300-310.

Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. (2001). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian J. Pharmacol.* **34**: 86-99.

Jin, Y., Chen, R., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z. (2009). Induction of estrogen responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. *Comput. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **150**, 414–420.

Kalkbrenner, A.E., Schmidt, R.J., Penlesky, A.C. (2014). Environmental Chemical Exposures and Autism Spectrum Disorders: A Review of the Epidemiological Evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* **44**, 277-318.

Karagül, S. (2006). *Sağlıklı ve İrreversible Pulpitisli Pulpa Dokularındaki 17β-Östradiol Hormon Varlığının Araştırılması ve Düzeylerinin Karşılaştırılması*. Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Karahan, H., Kelicen, E.P. (2011). Aromatase inhibitors in breast cancer therapy. *The Journal of Breast Health.* **Vol: 7**, No:2.

Kastenbaum, M.A., Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat. Res.* **9**, 527-549.

Kaya, B., Yanikoglu, A., Marcos, R. (1999). Genotoxicity Studies on the Phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* Wing Spot Test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis.* **19**, 305–312.

Kilic, A., Yesilada, E. (2013). Preliminary Results on Antigenotoxic Effects of Dried Mycelia of Two Medicinal Mushrooms in *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test. *International Journal of Medicinal Mushrooms.* **15(4)**, 415–421.

Knez, J. (2013). Endocrine-disrupting chemicals and male reproductive health. *Reproductive BioMedicine Online.* **26**, 440-448.

Korah, R.M., Humayun, M.Z. (1993). Mutagenic and recombinagenic effects of diethylstilbestrol quinone. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **289**, 205-214.

Kovacic, P. (2010). How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: Metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Med. Hypotheses*. **75**, 1-4.

Kurtoğlu, E.L. (2010). *Takrolimus'un Genotoksik Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek lisans tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Grubinger, F., Weismann, T. (2005). The effect of 4-nonylphenol on semen quality, viability of gametes, fertilization success, and embryo and larvae survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **71**, 297-306.

LaPensee, E.W., LaPensee, C.R., Fox, S., Schwemberger, S., Afton, S., Ben-Jonathan, N. (2010). Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Letters*. **290**, 167-173.

Lee, S., Liu, X., Takeda, S., Choi, K. (2013). Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: A comparison study employing chicken DT40 cells. *Chemosphere*. **93**, 434-440.

Lee, Y.J., Ryu, H.Y., Kim, H.K., Min, C.S., Lee, J.H., Kim, E., Nam, B.H., Park, J.H., Jung, J.Y., Jang, D.D., Park, E.Y., Lee, K.H., Ma, J.Y., Won, H.S., Im, M.W., Leem, J.H., Hong, Y.C., Yoon, H.S. (2008). Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod. Toxicol.* **25**, 413-419.

Li, B., Sun, L., Cai, J., Wang, C., Wang, M., Qiu, H., Zuo, Z. (2014). Modulation of the DNA repair system and ATR-p53 mediated apoptosis is relevant for tributyltin-induced genotoxic effects in human hepatoma G2 cells. *J. Environ. Sci.*

Li, D., Hu, Y., Shen, X., Dai, X., Han, X. (2010). Combined effects of two environmental endocrine disruptors nonyl phenol and di-n-butyl phthalate on rat Sertoli cells in vitro. *Reprod. Toxicol.* **30**, 438-445.

Liu, J., Cao, Q., Yuan, J., Zhang, X., Yu, L., Shi, H. (2012). Histological observation on unique phenotypes of malformation induced in *Xenopus tropicalis* larvae by tributyltin. *J. Environ. Sci.* **24(2)**, 195-202.

Liu, T., Li, Y., Zhao, X., Zhang, M., Gu, W. (2014). Ethylparaben affects lifespan, fecundity, and the expression levels of ERR, EcR and YPR in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **71**, 1-7.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods*. **25**, 402-408.

Madigou, T., Goff, P.L., Salbert, G., Cravedi, J.P., Segner, H., Pakdel, F., Valotaire, Y. (2001). Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* **53**, 173-186.

Mhatre, S.D., Michelson, S.J., Gomes, J., Tabb, L.P., Saunders, A.J., Marenda, D.R. (2014). Development and characterization of an aged onset model of Alzheimer's disease in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Neurol.* **261**, 772-781.

Micco, S.D., Renga, B., Carino, A., D'Auria, M.V., Zampella, A., Riccio, R., Fiorucci, S., Bifulco, G. (2014). Structural insights into Estrogen Related Receptor- β modulation: 4-Methylenesterols from *Theonella swinhoei* sponge as the first example of marine natural antagonists. *Steroids.* **80**, 51-63.

Michelangeli, F., Ogunbayo, O.A., Wootton, L.L., Lai, P.F., Al-Mousa, F., Harris, R.M., Waring, R.H., Kirk, C.J. (2008). Endocrine disrupting alkylphenols: Structural requirements for their adverse effects on Ca^{2+} pumps, Ca^{2+} homeostasis & Sertoli TM4 cell viability. *Chem. Biol. Interact.* **176**, 220-226.

Mills, L.H., Yu, J., Xu, X.M., Lee, A.J., Zhu, B.T. (2008). Naturally-occurring estradiol-17 β -fatty acid esters, but not estradiol-17 β , preferentially induce mammary tumorigenesis in female rats: Implications for an important role in human breast cancer. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **229**, 332-341.

Mitra, S., Srivastava, A., Khandelwal, S. (2013). Tributyltin chloride induced testicular toxicity by JNK and p38 activation, redox imbalance and cell death in sertoli-germ cell co-culture. *Toxicol.* **314**, 39-50.

Mollaoglu, H., Yilmaz, H.R., Gökalp, O., Altuntas, I. (2003). Methidathion'un Pankreas Üzerine Etkileri: Vitamin E ve C'nin Rolü. *Van Tıp Dergisi.* **10 (4)**, 98-100.

Morales, M., Martinez-Paz, P., Martin, R., Planello, R., Urien, J., Martinez-Guitarte, J.L., Morcillo, G. (2014). Transcriptional changes induced by *in vivo* exposure to pentachlorophenol (PCP) in *Chironomus riparius* (Diptera) aquatic larvae. *Aquat. Toxicol.* **157**, 1-9.

Morales, M., Paz, P.M., Ozáez, I., Guitarte, J.L.M., Morcillo, G. (2013). DNA damage and transcriptional changes induced by tributyltin (TBT) after short *in vivo* exposures of *Chironomus riparius* (Diptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **158**, 57-63.

Morris, S.T.S., Coogan, C., Chamseddin, K., Fernandez-Kim, S.O., Kolli, S., Keller, J.N., Bauer, J.H. (2012). Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1822**, 1230-1237.

Moura, A.P., Carvalho, G.A., Cosme, L.V., Alves, E., Botton, M., Silva, P.S. (2011). Toxicological and ultrastructural analysis of the impact of pesticides used in temperate fruit crops on two populations of *Chrysoperla externa* (Neuroptera, Chrysopidae). *Revista Brasileira de Entomologia.* **55**, 411-418.

Naylor, C.G. (1995). Environmental Fate and Safety of Nonylphenol Ethoxylates. *Textile Chemist & Colorist.* **27**, 29-33.

Necakov, A. (2010). *The In Vivo Function of Nuclear Receptors during Drosophila Development*. Doktora tezi, Department of Molecular Genetics University of Toronto.

Newman, M.C. (2013). *Ekotoksikoloji'nin Temel İlkeleri*. Palme Yayıncılık. Ankara, 541 p.

Nie, M., Yang, Y., Liu, M., Yan, C., Shi, H., Dong, W., Shou, J.L. (2014). Environmental estrogens in a drinking water reservoir area in Shanghai: Occurrence, colloidal contribution and risk assessment. *Sci. Total Environ.* **487**, 785-791.

Niikawa, M., Nagase, H. (2007a). Effect of aspirin on DNA damage induced by MMC in *Drosophila*. *Biomed. & Pharmacother.* **61**, 250-253.

Niikawa, M., Nakamura, T., Nagase, H. (2001). Suppressive effect of aspirin on chromosome aberration induced by mitomycin C mice. *Biol. Pharm. Bull.* **24**, 964-966.

Niikawa, M., Shin, S., Nagase, H. (2007b). Suppressive effect of post- or pre-treatment of aspirin metabolite on mitomycin C-induced genotoxicity using the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Biomed. & Pharmacother.* **61**, 113-119.

Okay, O.S. (2004). Antifouling içeren gemi boyalarının uluslararası kurallar çerçevesinde kirletici etkilerinin incelenmesi (pp:168-178). *Gemi Mühendisliği ve Sanayimiz Sempozyumu*, 24-25 Aralık, İstanbul.

Omura, M., Shimasaki, Y., Oshima, Y., Nakayama, K., Kubo, K., Aou, S., Ogata, R., Hirata, M., Inoue, N. (2004). Distribution of Tributyltin, Dibutyltin and Monobutyltin in the liver, brain and fat of rats: two-generation toxicity study of Tributyltin Chloride. *Environ. Sci.* **11**, 2, 123-132.

Orsolin, P.C., Silva-Oliveira, R.G., Nepomuceno, J.C. (2012). Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food and Chem. Toxicol.* **50**, 2598-2604.

Ortona, E., Pierdominici, M., L., Berstein, L. (2014). Autoantibodies to estrogen receptors and their involvement in autoimmune diseases and cancer. *J. Steroid Biochem.* **144**, 260-267.

Oruç, H.H., Cengiz, M., Bağdaş, D., Uzunoğlu, İ. (2007). Sığır Etlerinde Zeranol, Dietilstilbestrol, Klenbuterol, 17β-Östradiol ve Testosteron Kalıntıları. *Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med.* **26**, 1-2: 11-15.

Palermo, F.A., Cocci, P., Angeletti, M., Polzonetti-Magni, A., Mosconi, G. (2012). PCR-ELISA detection of estrogen receptor β mRNA expression and plasma vitellogenin induction in juvenile sole (*Solea solea*) exposed to waterborne 4-nonylphenol. *Chemosphere.* **86**, 919-925.

Park, K., Kim, R., Park, J.J., Shin, H.C., Lee, J.S., Cho, H.S., Lee, Y.G., Kim, J., Kwak, I.S. (2013). Ecotoxicological evaluation of tributyltin toxicity to the equilateral venus clam, *Gomphina veneriformis* (Bivalvia: Veneridae). *Fish & Shellfish Immunol.* **32**, 426-433.

- Park, K., Kwak, I.S. (2010). Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. *Chemosphere*. **79**, 934–941.
- Park, W., Kim, G.J., Choi, H.S., Vanacker, J.M., Sohn, Y.C. (2009). Conserved properties of a urochordate estrogen receptor-related receptor (ERR) with mammalian ERR α . *Biochim. Biophys. Acta*. **1789**, 125–134.
- Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F. (2014). Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids*. **90**, 13–29.
- Pickford, D.B., Hetheridge, M.J., Caunter, J.E., Hall, A.T., Hutchinson, T.H. (2003). Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere*. **53**, 223–235.
- Potter, C.J., Turenchalk, G.S., Xu, T. (2000). *Drosophila* in cancer Research an expanding role. *TIG*. volume 16, No. 1.
- Prokop, Z., Hankova, L., Jerabek, K. (2004). Bisphenol A synthesis—modefng of industrial reactor and catalyst deactivation. *Reactive & Functional Polymers*. **60**, 77–83.
- Quignot, N., Arnaud, M., Robidel, F., Lecomte, A., Tournier, M., Cren-Olivé, C., Barouki, R., Lemazurier, E. (2012). Characterization of endocrine-disrupting chemicals based on hormonal balance disruption in male and female adult rats. *Reprod. Toxicol.* **33**, 339–352.
- Raecker, T., Thiele, B., Boehme, R.M., Guenther, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere*. **82**, 1533–1540.
- Rao, J., Jiang, X., Wang, Y., Chen, B. (2011). Advances in the understanding of the structure and function of ER- α 36, a novel variant of human estrogen receptor- α . *J. Steroid Biochem.* **127**, 231–237.
- Richardson, S.R., Pierens, S.L., Nichols, K.M., Kramer, V.J., Snyder, E.M., Synder, S.A., Render, J.A., Fitzgerald, S.D., Giesy, J.P. (1999). Effects of Waterborne Exposure to 4-Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylate on Secondary Sex Characteristics and Gonads of Fathead Minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Research Section A*. **80**, 122–137.
- Rincon, J.G., Graf, U. (1995). *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Plenum Press*, New York, 169–179.
- Rivero, C.L.G., Barbosa, A.C., Ferreira, M.F.N., Dorea, J.G., Grisolia, C.K. (2008). Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: cichlidae). *Ecotoxicol.* **17**, 732–737.
- Rodriguez-Arnaiz, R., Soto, P.O., Oyarzun, J.C.G., Graf, U. (1996). Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* **351**, 133–145.

Romano, A., Adriaens, M., Kuenen, S., Delvoux, B., Dunselman, G., Evelo, C., Groothuis, P. (2010). Identification of novel ER- α target genes in breast cancer cells: Gene- and cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17 β -estradiol and tamoxifen. *Mol. Cell. Endocrinol.* **314**, 90–100.

Sarikaya, R., Memmi, B.K. (2013). Detection of transfluthrin and metofluthrin genotoxicity in the ST cross of the *Drosophila* Wing Spot Test. *Chemosphere.* **93**, 238–242.

Sayed, A.E.D.H., Mahmoud, U.M., Mekkawy, I.A. (2012). Reproductive biomarkers to identify endocrine disruption in *Clarias gariepinus* exposed to 4-nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **78**, 310–319.

Scholz, H., Ramond, J., Singh, C.M., Heberlein, U. (2000). Functional Ethanol Tolerance in *Drosophila*. *Neuron.* **28**, 261–271.

Schreiber, S.N., Emter, R., Hock, M.B., Knutti, D., Cardenas, J., Podvinec, M., Oakeley, E.J., Kralli, A. (2004). The estrogen-related receptor α (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis. *PNAS.* **101**, 6472–6477.

Seyran, A., Erişir, M. (2008). Poliklorlu Bifeniller ve Sağlık Üzerine Etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağ. Bil. Derg.* **22 (1)**: 33 – 40.

Sharan, S., Nikhil, K., Roy, P. (2013). Effects of low dose treatment of tributyltin on the regulation of estrogen receptor functions in MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **269**, 176–186.

Shyu, C., Cavileer, T.D., Nagler, J.J., Ytreberg, F.M. (2011). Computational estimation of rainbow trout estrogen receptor binding affinities for environmental estrogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **250**, 322–326.

Silva, P.V., R. Silva, A.R., Mendo, S., Loureiro, S. (2014). Toxicity of tributyltin (TBT) to terrestrial organisms and its species sensitivity distribution. *Sci. Total Environ.* **466–467**, 1037–1046.

Stavropoulos, P., Athanasopoulos, P.E., Kyriakidis, N.B. (2000). Degradation of pyrazophos and methidathion in fortified red and white wine under conditions of light and darkness. *Food Chem.* **72**, 473–477.

Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., Shimohigashi, Y. (2006). Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. *Toxicol. Lett.* **167**, 95–105.

Takayasu, T., Ishida, Y., Nosaka, M., Kawaguchi, M., Kuninaka, Y., Kimura, A., Kondo, T. (2012). High concentration of methidathion detected in a fatal case of organophosphate-poisoning. *Legal Med.* **14**, 263–266.

Takeuchi, T., Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **291**, 76–78.

Tayama, S., Nakagawa, Y., Tayama, K. (2008). Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat. Res.* **649**, 114–125.

Tennessen, J.M., Baker, K.D., Lam, G., Evans, J., Thummel, C.S. (2011). The Drosophila Estrogen-Related Receptor Directs a Metabolic Switch that Supports Developmental Growth. *Cell Metab.* **13**, 139–148.

Touatia, K.R., Boussema, I.A., Guedri, Y., Achour, A., Bacha, H., Abid, S. (2013). Role of recombinant human erythropoietin in mitomycin C-induced genotoxicity: Analysis of DNA fragmentation, chromosome aberrations and micronuclei in rat bone-marrow cells. *Mutat. Res.* **753**, 48– 53.

Turan, F., Akyurt, İ., Yıldırım, Y., Çek, Ş., Turan, C. (2005). β -Estradiol'ün Zebra Çiklit (*Cichlasoma nigrofasciatum* Günter,1868)'de Büyüme Üzerine Etkisi. *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi.* **17**, 335-341.

U.S. Environmental Protection Agency USEPA. (2000). *Endocrine Disruptor Screening Program Report to Congress*. U.S. Environmental Protection Agency www.epa.gov. Washington, D.C.

Um, S.J., Youn, H., Kim, E.J. (2012). Negative regulation of ERR α by novel nucleolar protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **418**, 290-295.

Vardar, E., Harjono, M. (2002). *Zehirli hurda gemi sökümü: Yasadışı tehlikeli atık ticareti*. Greenpeace Akdeniz Ofisi, Aliağa Gemi Söküm Tesisleri'ndeki Çevre, Sağlık ve Çalışma Koşulları hakkında Greenpeace Raporu, İzmir.

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.

Vivacqua, A., Recchia, A.G., Fasanella, G., Gabriele, S., Carpino, A., Rago, V., Gioia, M.L.D., Leggio, A., Bonofiglio, D., Liguori, A., Maggiolini, M. (2003). The food contaminants Bisphenol A and 4-Nonylphenol act as agonist for estrogen receptor α in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine.* **22**, 275-284.

Vural, N. (2005). *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 73. Ankara, 659 p.

Walker, B.E., Kurth, L.A. (1993). Pituitary Tumors in Mice Exposed Prenatally to Diethylstilbestrol. *Cancer Res.* **53**, 1546-1549.

Wang, H., Wang, J., Wu, T., Qin, F., Hu, X., Wang, L., Wang, Z. (2011). Molecular characterization of estrogen receptor genes in *Gobiocypris rarus* and their expression upon endocrine disrupting chemicals exposure in juveniles. *Aquat.Toxicol.* **101**, 276–287.

Wang, H., Yan, Z., Li, H., Yang, N., Leung, K.M.Y., Wang, Y., Yu, R., Zhang, L., Wang, W., Jiao, C., Liu, Z. (2012). Progress of environmental management and risk assessment of industrial chemicals in China. *Environ. Pollut.* **165**, 174-181.

Watanabe, T., Kasai, T., Arima, M., Okumura, K., Kawabe, N., Hirayama, T. (1996). *Genotoxicity in vivo of phenazine and aminophenazines assayed in the wing spot test and the DNA-repair test with Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. **369**, 75-80.

Watts, M., Pascoe, D., Carroll, K. (2001). Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Aquat. Toxicol.* **55**, 113–124.

Wheeler, M.R. (1981). The Drosophilidae: A Taxonomic overview. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, M. Ashburner, H. L. Carsen, J. Thompson, J. N. Academic Press INC. Ltd. London, **3a**, 1-84.

Würgler, F.E., Vogel, E.V. (1986). In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*, Chemical mutagens, Principles and Methods for Their detection. *Plenum Press*. New York, 1-72.

Yavuz, T., Delibas, N., Yildirim, B., Altuntas, I., Candır, O., Cora, A., Karahan, N., Ibrism, E., Kutsal, A. (2005). *Toxicol. Lett.* **155**, 59–64.

Yehoyada, B.M., Gautier, J., Dupr'e, A. (2007). The DNA damage response during an unperturbed S-phase. *DNA Repair*. **6**, 914-922.

Yeşilkaya, E. (2008). Endocrine Disruptors. *Güncel Pediatri*. **6**, 76-82.

Yıldırım, G. (2011). *Prostat Kanseri Hücre Hattında ERR (Östrojen Reseptörü İlişkili Reseptör) Aracılı Cevap Değişikliklerinin İncelenmesi*. Yüksek Lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.

Yıldız, N. (2009). *Çevresel Östrojenlerden Bisfenol A ve Oktifenolün Erkek Sıçanlarda Subkronik Etkileri*. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Yiğit, F. (2009). *Çevresel Östrojen Bisphenol A'nın Tavukların Genital Organları Üzerine Etkileri*. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Yu, A., Wang, X., Zuo, Z., Cai, J., Wang, C. (2013). Tributyltin exposure influences predatory behavior, neurotransmitter content and receptor expression in *Sebastiscus marmoratus*. *Aquat. Toxicol.* **128–129**, 158–162.

Yu, L., Chen, M., Liu, Y., Gui, W., Zhu, G. (2013). Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquat. Toxicol.* **138-139**, 35-42.

Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F. (2014). Gıda koruyucuları ve genotoksosite testleri. *Gıda*. **39**, 179-186.

Zemheri, F. (2011). *Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Ames/Salmonella/ Mikrozom Test Yöntemi Kullanılarak Mutajenik Etkisinin Belirlenmesi*. Yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.

Zhang, J., Zuo, Z., Xiong, J., Sun, P., Chen, Y., Wang, C. (2013). Tributyltin exposure causes lipotoxicity responses in the ovaries of rockfish, *Sebastiscus marmoratus*. *Chemosphere*. **90**, 1294–1299.

Zhang, J., Zuo, Z., Zhu, W., Sun, P., Wang, C. (2013). Sex-different effects of tributyltin on brain aromatase, estrogen receptor and retinoid X receptor gene expression in rockfish (*Sebastiscus marmoratus*). *Marine Environmental Research*. **90**, 113-118.

Zheng, R., Wang, C., Zhao, Y., Zuo, Z., Chena, Y. (2005). Effect of tributyltin, benzo(a)pyrene and their mixture exposure on the sex hormone levels in gonads of cuvier (*Sebastiscus marmoratus*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **20**, 361–367.

Zuo, Z.H., Wang, C.G., Wu, M.F., Wang, Y.Q., Chen, Y.X. (2012). Exposure to tributyltin and triphenyltin induces DNA damage and alters nucleotide excision repair gene transcription in *Sebastiscus marmoratus* liver. *Aquat. Toxicol.* **122–123**, 106–112.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Aygöl KILIÇ KARABULUT

Doğum Yeri ve Tarihi: Ankara, 1983

E-posta: aygul.kilic@inonu.edu.tr

Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Malatya (2001-2005)

Yüksek Lisans: İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Malatya (2005-2008)

Mesleki Deneyim: Araştırma Görevlisi (2007-.....)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Kilic A, Yesilada E. " Preliminary Results on Antigenotoxic Effects of Dried Mycelia of Two Medicinal Fungi in *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination (SMART) Test". ***International Journal of Medicinal Mushrooms***. 15(4): 415–421 (2013).
2. Aygul Kilic Karabulut, Elif Yesilada, "Genotoxicity Testing of Tributyltin and Methidathion in *Drosophila melanogaster* Using The Wing Somatic Mutation and Recombination Test" ***Fresenius Environmental Bulletin***. Vol. 23; No.12 (2014).

Tezden Türetilen Sunumlar

1. **Aygöl KILIÇ**, Elif YEŞİLADA, 15-18 Kasım 2012, ‘Bisfenol A (BFA) ve 4-Nonilfenol (4-NP)’in Genotoksik Etkisinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon (SMART) Testi İle Araştırılması’, **Uluslar Arası Katılımlı 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi**, Antalya Falez Otel.
2. **Aygöl KILIÇ**, Elif YEŞİLADA, June 18-21, 2013, ‘Genotoxicity testing of tributyltin in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test (SMART)’. **International Conference on Environmental Science and Technology- Cappadocia**, Ürgüp, Nevşehir Turkey.

3. Aygöl KILIÇ KARABULUT, Elif YEŞİLADA, 01-04 Ekim 2013,
'Methidathion'un Genotoksik Etkisinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Araştırılması', **XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi**, Samsun.

4. Aygöl KILIÇ KARABULUT, Elif YEŞİLADA, 23-27 Haziran 2014,
'Dietilstilbestrol (DES) ve 17 β -estradiol (E2)'ün Genotoksik Etkisinin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Araştırılması', **Uluslararası Katılımlı 22. Ulusal Biyoloji Kongresi**, Eskişehir.